

Aus der
Klinik für Vögel
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. R. Korbel)

Angefertigt unter Anleitung von
Univ.-Prof. Dr. R. Korbel

**Untersuchungen zur
in-vitro-Antibiotikaempfindlichkeit aerober Bakterien
beim Wirtschaftsgeflügel mittels Agardiffusionstest
und Bouillon-Mikrodilutionsmethode**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Franz Xaver Kronthaler
aus
Freising

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Korbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	9
2 LITERATURÜBERSICHT	11
2.1 Häufige aerobe bakterielle Erreger des Wirtschaftsgeflügels	11
2.1.1 Escherichia	11
2.1.2 Enterococcus und Streptococcus	12
2.1.3 Klebsiella	12
2.1.4 Pasteurella	13
2.1.5 Pseudomonas	14
2.1.6 Salmonella	14
2.1.7 Staphylococcus	15
2.2 Antibiotika mit Bedeutung beim Wirtschaftsgeflügel	17
2.2.1 β -Lactame	18
2.2.2 Aminoglykoside	20
2.2.3 Gyrasehemmer	21
2.2.4 Polypeptidantibiotika	22
2.2.5 Tetrazykline	23
2.2.6 Lincosamide	24
2.2.7 Macrolide	25
2.2.8 Sulfonamide und Trimethoprim	26
2.2.9 Pleuromutilin-Antibiotika	27
2.3 Bakterielle Resistenzen gegenüber antibiotischen Wirkstoffen	28
2.3.1 Resistenzentwicklung	28
2.3.2 Resistenzmechanismen	30
2.3.2.1 Modifikation und Abbau des Antibiotikums	30
2.3.2.2 Änderung der Zielstruktur	30
2.3.2.3 Aktive Entfernung des Wirkstoffes aus der Zelle	32
2.3.3 Bedeutung des Antibiotikaeinsatzes für die Resistenzentwicklung	32
2.3.4 Bedeutung für Mensch und Tier	33
2.3.5 Monitoring antibiotischer Resistenzen beim Geflügel	35

2.4 <i>In-vitro</i>-Empfindlichkeitsbestimmung bakterieller Keime	37
2.4.1 Agardiffusionstest	38
2.4.2 Bouillon-Dilutionstest/Reihenverdünnungstest	39
2.4.3 Epsilon-Test (E-Test)	40
2.4.4 Vergleichbarkeit der Methoden	41
2.4.5 Durchführungsvorschriften und Grenzwerte	42
2.4.6 In-vivo-Relevanz von Ergebnissen der Empfindlichkeitstests	47
 3 MATERIAL UND METHODEN	 48
3.1 Material	48
3.1.1 Herkunft und Anzahl der bakteriellen Isolate	48
3.1.2 Kontrollstämme	49
3.1.3 Nähragar- und Mikrotitterplatten	51
3.1.4 Antibiotische Wirkstoffe	53
3.2 Methoden	53
3.2.1 Anzucht und Differenzierung der Bakterien	53
3.2.2 Agardiffusionstest	55
3.2.3 Hemmhofdurchmesser	58
3.2.4 Bouillon-Mikrodilutionsmethode	58
3.2.5 Minimale Hemmkonzentration und Grenzwerte (break points)	61
3.2.6 Kontrollstammführung	62
3.3 Datenauswertung	63
 4 ERGEBNISSE	 65
4.1 Agardiffusionstest	65
4.2 Bouillon-Mikrodilutionsmethode	69
4.2.1 Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration	70
4.2.2 Resistenzlage	70
4.3 Ergebnisse von Agardiffusion und Mikrodilution im Vergleich	72
4.4 Ergebnisse der Referenzstammführung	77

5	DISKUSSION	79
5.1	Besprechung der Testdurchführung	79
5.2	Besprechung der Ergebnisse der Agardiffusion	81
5.3	Besprechung der Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution	82
5.4	Vergleich zwischen Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution	84
5.5	Schlussfolgerungen	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	90
8	LITERATURVERZEICHNIS	92
9	ANHANG	105
9.1	Abbildungsverzeichnis	105
9.2	Tabellenverzeichnis	107
9.3	Zusammensetzung der Fertignährböden	109
9.4	Ergebnis-Tabellen (Empfindlichkeit)	113
9.4.1	Agardiffusion	113
9.4.2	Bouillon-Mikrodilution	115
9.5	MHK-Ergebnisse	118
9.6	Kreuztabellen von Ergebnissen beider Methoden	125
10	DANKSAGUNG	132

Abkürzungsverzeichnis

AB	= Antibiotika
Amp	= Ampicillin
Amo	= Amoxicillin
ATCC	= American Type Culture Collection
BSAC	= British Society for Antimicrobial Chemotherapy
BVL	= Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
°C	= Grad Celsius
CA-SFM	= Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
Col	= Colistin
Cli	= Clindamycin
CLSI	= Clinical and Laboratory Standards Institute
DIN	= Deutsches Institut für Normung
DSM	= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVG	= Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
Enr	= Enrofloxacin
Ery	= Erythromycin
et al.	= et alli
HHD	= Hemmhofdurchmesser
i	= intermediär
IE (IU)	= Internationale Einheit (International Unit)
Lin	= Lincomycin
MHK	= Minimale Hemmkonzentration
MHK _{50(bzw. 90)}	= Minimale Hemmkonzentration eines Wirkstoffes, welche die Vermehrung von mindestens 50 (bzw. 90)% der getesteten Stämme verhindert
MRSA	= Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	= National Committee for Clinical Laboratory Standards
Neo	= Neomycin
PBP	= Penicillin-bindende Proteine

PCR	= Polymerase Chain Reaction
Pen	= Penicillin
r	= resistant
s	= sensibel
Spe	= Spectinomycin
Spez.	= Spezies
<i>sp./ spp.</i>	= species/ species pluralis
<i>Staph.</i>	= <i>Staphylococcus</i>
SXT	= Trimethoprim-Sulfamethoxazol
Tia	= Tiamulin
Til	= Tilmicosin
VETIDATA	= Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel- anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht
WHO	= World Health Organisation

1 Einleitung

Seit der Entdeckung des ersten Antibiotikums 1928 durch den schottischen Bakteriologen Alexander Fleming, welcher als erstes das medizinische Potential des Penicillins erkannte, und der erfolgreichen Isolierung von Penicillin aus Kulturfiltraten, begann 1940 die Ära der antimikrobiellen Wirkstoffe (BfT 1999). Seither haben sich Antibiotika und antimikrobielle Chemotherapeutika schnell ihren Weg in die Medizin gebahnt. Diese große Wirkstoffgruppe ist schon lange nicht mehr aus der Human- und Tiermedizin wegzudenken. Auch schwerwiegende und früher viel zu oft tödlich verlaufende Infektionserkrankungen können heute mit dem richtigen antibiotischen Wirkstoff meist erfolgreich therapiert werden. Hierfür steht mittlerweile eine Vielzahl von Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkstoffen zur Auswahl. Gerade auch in der Tiermedizin stellen Antibiotika einen wesentlichen Bestandteil der medikamentösen Versorgung von Patienten dar. Dabei gilt es seit jeher auch, an bakteriellen Erregern erkrankte Nutztiere zu behandeln, welche heutzutage meist in großen Tierbeständen zu finden sind. Besonders auch die Gesunderhaltung von Geflügel und die Vermeidung krankheitsbedingter Verluste in Nutzgeflügelbeständen erfordern regelmäßig den Einsatz von Antibiotika. Daher stehen in Deutschland heute über 20 unterschiedliche antibiotische Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen zur Therapie geflügelpathogener Bakterien zur Verfügung (QS 2008). Denn zum Teil kann nur eine Antibiose die rasche Ausbreitung von Krankheitserregern und damit große Verluste verhindern. Solange man sich die Wirkung von Antibiotika bereits zu Nutze macht, solange ist auch die Resistenzentwicklung vieler Krankheitserreger gegenüber antibiotischen Wirkstoffen schon bekannt. Aufgrund der Fähigkeit von Bakterien solche Resistenzen zu entwickeln, können antibiotische Wirkstoffe plötzlich unwirksam gegenüber diesen Keimen werden. Dies ist ein Problem, mit dem man auch in der tierärztlichen Praxis konfrontiert ist. Dazu kommt die Gefahr durch resistente Keime, welche vom Tier auf den Menschen übergehen und dort zum Therapieproblem werden können. Dies wurde schon längst auch international erkannt (WHO 1997). Daher ist es nötig die Wirksamkeit eines Antibiotikums gegenüber einem bestimmten Keim vor der Therapie zu überprüfen, d.h. die Resistenzlage des Keimes muss untersucht werden, um sicher zu gehen, dass dieser mit einem eingesetzten Antibiotikum auch wirkungsvoll bekämpft werden

kann. Die Antibiotikaleitlinien sehen als wichtige Entscheidungsgrundlage für die Wahl des richtigen Antibiotikums in Notfallsituationen die Ergebnisse eines regelmäßigen Resistenzmonitorings an (BTK ArgeVET 2000). Zur Empfindlichkeitstestung von Bakterien stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, deren Entwicklung schon bald begann, nachdem die Antibiotikatherapie ihren Anfang genommen hatte (WHEAT 2001). Auch im Bereich der Nutzgeflügelhaltung kommen Antibiotika regelmäßig zum Einsatz. Für die erfolgreiche Behandlung einer bakteriellen Infektionserkrankung benötigt der praktische Tierarzt neben einem Grundwissen über Primärresistenzen verschiedener Bakterien sowie über Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von antibiotischen Wirkstoffen auch Informationen über die aktuelle Resistenzlage des zu behandelnden Krankheitserregers. Es kann vermutet werden, dass sich die Resistenzsituation auch regional unterscheidet. Dennoch gibt es nur vereinzelt aktuelle Daten über die Empfindlichkeitstestung von geflügelassoziierten Bakterien in Deutschland. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Empfindlichkeit bedeutender aerober bakterieller Keime des Wirtschaftsgeflügels gegenüber gängigen Antibiotika zu ermitteln. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Der Agardiffusionstest zur Ermittlung der qualitativen Empfindlichkeit der Keime und der Bouillon-Mikrodilutionstest, welcher zudem die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration und damit eine quantitative Aussage erlaubt. Anhand der Ergebnisse sollte zum einen ein Überblick über die derzeitige Resistenzlage verschiedener Keime beim Wirtschaftsgeflügel im Einzugsbereich der Klinik für Vögel gegeben werden, zum anderen sollten die Ergebnisse beider Methoden verglichen werden, um eine Einschätzung über deren Nutzen und Möglichkeiten für die Empfindlichkeitstestung tiermedizinisch relevanter Bakterien des Wirtschaftsgeflügels treffen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Häufige aerobe bakterielle Erreger des Wirtschaftsgeflügels

2.1.1 Escherichia

Zur Gattung der ubiquitär vorkommenden Bakterien der Gattung *Escherichia* gehören gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Darin finden sich auch human- und tierpathogene Erreger. Es handelt sich um 2,0 bis 6,0 µm lange und 1,1 – 1,5 µm breite, meist durch peritriche Begeißelung bewegliche Stäbchen, die teilweise auch zur Hämolyisin-Bildung und zu schleimigen Wachstum fähig sind. Sie sind oxidasenegativ und fähig zur Lactosespaltung. *E. coli* kommt bei Mensch und Tier als Bestandteil der Normalflora vor, hat aber dennoch größte Bedeutung als Krankheitserreger (SELBITZ 2007). Der Keim wächst bei 37 °C auf üblichen Nährmedien (HINZ et al. 2005). *E. coli* lässt sich durch positive β-Glucuronidase- und β-Galactosidasereaktion von anderen lactosepositiven, coliformen Keimen unterscheiden. Eine Serotypisierung von *E. coli* ist anhand der O-Antigene (Zellwand), der K-Antigene (Kapselantigene), der F-Antigene (Fimbrien) und der H-Antigene (Geißelantigene) möglich. Über eine O:K:H-Seroformel ergeben sich über 10000 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Eine Vielzahl von *E. coli*-Stämmen ist Bestandteil der normalen Darmflora. Die pathogene Wirkung hängt von Endo-, Entero- und Cytotoxinen sowie Adhäsionsfaktoren ab. Die geflügelpathogenen *E. coli*-Stämme werden als APEC (avian pathogenic *E. coli*) bezeichnet, die meist in Form der Serovare 01:K1, 02:K1 und 078:K80 auftreten (EWERS 2003, SELBITZ 2007). Die Serotypen 01, 02, 078 und 0111 werden bei der Coliseptikämie oder Colibazillose, einer weltweit bedeutsamen systemischen Erkrankung von Küken und Hühnern, gefunden. Die Coligranulomatose, eine meist bei älteren Legehennen sporadisch auftretende granulomatöse Erkrankung, wird von *E. coli* - Stämmen der Serotypen 08, 09 sowie anderen Serotypen mit ausgeprägter Kapselbildung ausgelöst (HINZ et al. 2005). Beim Menschen verursacht *E. coli* eine Vielzahl von intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen, wobei besonders Infektionen mit enterotoxischen (ETEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) von Bedeutung sind (SELBITZ 2007).

2.1.2 Enterococcus und Streptococcus

Bis die Gattung *Enterococcus* abgetrennt wurde gehörte sie zur Gattung *Streptococcus*, in der sie aber bereits eine Sonderstellung hatte. Entsprechend gehören zu dieser Gruppe grampositive Kokken, die keine Katalase bilden. Enterokokken zeigen Wachstum im Bereich von 10 – 45 °C, bei pH-Wert 9,6 sowie bei Zusatz von 6,5 % NaCL und 40 % Galle. Ein Galle-Äsculin-Agar kann daher zur Isolierung und vorläufigen Abgrenzung von Streptokokken dienen. Weiterhin dient der Nachweis der Pyrrolidonyl-Peptidase der Abgrenzung. Die meisten *Enterococcus* - Stämme besitzen das Gruppenantigen D. Enterokokken gehören zur normalen Darmflora, sie werden aber auch als Krankheitserreger vorgefunden. Die bedeutendsten Stämme sind *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus durans*. Aufgrund hoher Wahrscheinlichkeit von Antibiotikaresistenzen sind Resistenzprüfungen besonders wichtig. *Enterococcus faecalis* wird mit der amyloiden Arthropathie der Hühner in Verbindung gebracht (SELBITZ 2007). Auch eine *Enterococcus hirae* – assoziierte Enzephalitis bei Hühnerküken kommt vor (HINZ et al. 2005). *Enterococcus* - Infektionen können Geflügel aller Altersgruppen betreffen. Es wird ein akut bis chronischer Krankheitsverlauf beobachtet. Klinisch treten Septikämien, Depression, Lethargie, Durchfall, Gewichtsverlust, Lahmheit und verringerte Legeleistung in Erscheinung. Auch Hepatomegalie, Splenomegalie, Arthritiden, Sehnenscheidenentzündungen und eine fibrinöse Perihepatitis können unter Umständen vorgefunden werden. Eigentliche Streptokokken wie *Streptococcus zooepidemicus* spielen nur eine untergeordnete Rolle beim Geflügel, können aber zu Erkrankungen führen (THAYER et al. 2008). Enterokokken sind wichtige Erreger nosokomialer Infektionen des Menschen und haben daher große Bedeutung als Krankenhauskeime. Besonders problematisch ist dabei das Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken, die eine Therapie erschweren (WERNER et al. 2008).

2.1.3 Klebsiella

Zu dieser Gattung zählen unbewegliche Enterobakterien mit ausgeprägter Kapselbildung und typischen Wachstum in schleimigen Kolonien. Es handelt sich um gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die auch zur Normalflora bei Tieren gehören und in der Umwelt vorkommen. Virulenzfaktoren sind die polysaccharidhaltige Kapsel, Endotoxine, Adhäsionsantigene und Enterotoxine.

Meist kommt es zu faktoerenbedingter Infektion. Die größte Bedeutung als Krankheitserreger bei Mensch und Tier hat *Klebsiella pneumoniae*, ein Keim, der beim Menschen u. a. an Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen und Septikämien beteiligt ist (SELBITZ 2007). Dieses, 0,3 – 1,5 µm auf 1,2 – 3 µm große, Bakterium bewirkt beim Geflügel in der Folge anderer bakterieller oder viraler Krankheitserreger meist sekundäre Infektionen. Über Übertragungswege und Pathogenese ist wenig bekannt. Beobachtet wird ein gestörtes Allgemeinbefinden des betroffenen Geflügels mit Dyspnoe und Durchfall. Dottersackentzündung, katarrhalische-fibrinöse Entzündung der Atemwege, exudative Serositis, katarrhalische Enteritis, Leber-, Milz- und Nierenschwellung können vorgefunden werden (HINZ et al. 2005).

2.1.4 Pasteurella

Bei dieser Gruppe handelt es sich um unbewegliche, kokkoide bis kurze Stäbchenbakterien, die Katalase und Oxidase bilden. Sie zeichnen sich durch eine parasitäre Lebensweise bei Wirbeltieren aus. Ihre Bipolarität lässt sich durch Färbung mit Methylenblau erkennen. Die Serotypisierung ist mit O - und K - Antigenen möglich. Virulenzfaktoren sind eine Kapsel, Proteine der äußeren Membran, Fimbrien, Neuraminidase, Endo- und Exotoxine. *Pasteurella multocida* ist einer der wichtigsten Krankheitserreger dieser Gruppe (SELBITZ 2007). Auf Blutagar wachsen Pasteurellen nach 24 Stunden bei 37 °C als kleine opaque bis graue Kolonien (VON GRAEVENITZ et al. 2007). *Pasteurella multocida* ist der Erreger der Geflügelcholera, einer akut bis chronisch, zum Teil seuchenhaft verlaufenden Erkrankung des Geflügels. Die 0,2 – 0,4 auf 0,6 – 2,5 µm großen primärpathogenen Keime führen neben perakuten Todesfällen nach direkter oder indirekter Übertragung oder durch Bissverletzung zu einer respiratorischen Erkrankung mit Pneumonie, Sinusitis, Rhinitis und Schwellung der Kehllappen. Des Weiteren werden Serositiden, Arthritiden und Torticollis beobachtet. Die Virulenz der verschiedenen Serovare ist sehr variabel (HINZ et al. 2005). Beim Menschen treten Wundinfektionen mit *Pasteurella multocida* nach Biss- oder Kratzverletzungen durch Hunde oder Katzen auf (SELBITZ 2007).

2.1.5 Pseudomonas

Pseudomonaden sind 0,5-1,0 x 1,5 – 5,0 µm große, bewegliche, aerobe und gramnegative Stäbchenbakterien mit Oxidase- und Katalasetätigkeit. Mehrere Dutzend Spezies sind beschrieben, die auch als Saprophyten oder Verursacher von Lebensmittelverderbnis vorzufinden sind. Von medizinischem Interesse ist fast ausschließlich *Pseudomonas aeruginosa*. Der Erreger stellt keine besonderen Ansprüche an Nährmedien und seine Stämme wachsen bei Temperaturen von 4 °C bis zu 42 °C mit einem Optimum bei 37 °C. Meist tritt auf Blutplatten eine Hämolyse auf und von den flachen Kolonien geht ein charakteristischer Geruch aus. Diese Eigenschaften erlauben bereits eine Verdachtsdiagnose. Im Gegensatz zu Aeromonaden sind Pseudomonaden nicht zur fermentativen Kohlenhydratverwertung fähig (SELBITZ 2007). *Pseudomonas aeruginosa* führt zu septikämischen Infektionen junger Küken und kann als schwerwiegender Komplikationsfaktor von lokalisierten Entzündungsprozessen und Läsionen der Haut und der Schleimhäute eine wichtige Rolle spielen. Die 0,3 – 0,6 µm x 1,5 – 3 µm großen, in der Umwelt äußerst widerstandsfähigen, Keime sind weit verbreitet. Neben schweren septikämischen Erkrankungen und Embryosterblichkeit werden v. a. respiratorische Symptome zusammen mit entzündlichen Ödemen im Kopfbereich sowie Bewegungsstörungen, infolge exudativer Arthritiden, und Diarrhoe beobachtet. Dabei können Blutungen und Ödeme in der Unterhaut und den serösen Häuten, aber auch eine Perikarditis, Perihepatitis und Aerosacculitis vorgefunden werden (HINZ et al. 2005). Beim Menschen ist *Pseudomonas aeruginosa* als gefährliche Ursache von Hospitalinfektionen bedeutsam (SELBITZ 2007).

2.1.6 Salmonella

Salmonellen gehören zu den bedeutensten bakteriellen Infektionserregern bei Mensch und Tier. Salmonellen werden in die beiden Spezies *Salmonella enterica* (mit sechs Subspezies) und *Salmonella bongori* unterteilt. Auf Basis von O- und H-Antigenen lassen sich im Kaufmann-White-Schema über 2500 Serovare definieren. Salmonellen sind gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien von 0,7 – 1,5 x 2,0 – 5,0 µm Größe, die bis auf wenige Ausnahmen (*Salmonella Gallinarum*) beweglich sind. Sie vermögen die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und die Bildung von H₂S ebenso wie den Abbau von Propylenglykol und die Nutzung von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle. Die Fähigkeit zum Lactoseabbau und eine Hämolyse auf

Blutagar fehlen. Jedes Isolat von Tieren ist als potentieller Zoonoseerreger zu betrachten bis, nach entsprechender Prüfung, Serovare oder Stämme als avirulent für Menschen oder bestimmte Tiere eingestuft werden können. Virulenzfaktoren sind die Adhäsivität, die Invasivität, der fakultativ intrazelluläre Parasitismus und die Bildung von Endo-, Cyto- und Enterotoxinen (SELBITZ 2007). Die Anzucht von Salmonellen erfolgt meist über eine spezielle Anreicherung z.B. mit Peptonwasser und Rappaport-Vasiliadis-Medium o. a. (DIN 2007). Salmonellen besitzen eine hohe Tenazität in der Umwelt, wo diese, milieuabhängig, Monate lang überdauern können. Salmonellen lösen beim Vogel akute bis chronische oder symptomlose Erkrankungen aus. Der Erreger wird direkt oder indirekt aufgenommen und verbreitet sich horizontal oder vertikal. Symptomatisch treten beim Geflügel neben gestörtem Allgemeinbefinden und Durchfall auch Abmagerung, entzündete Gelenke, Embryosterblichkeit, septikämische Erkrankungen, zentralnervöse Störungen und Lahmheiten sowie eine Konjunktivitis auf. Eine erhöhte Mortalität zeigt sich v.a. bei Küken. Zu unterscheiden sind an das Geflügel adaptierte Salmonellen wie *Salmonella Gallinarum*/ *Pullorum* (Erreger der sogenannten „Weißen Kükenruhr“ oder „Pullorumseuche“) oder *Salmonella Arizona* und nicht tieradaptierte Serovare wie *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Infantis*, *Salmonella Virchow* u. a.. Diese haben eine sehr große Bedeutung als zoonotische Infektionserreger beim Menschen (HINZ et al. 2005). Salmonellen beim Geflügel sind meldepflichtig (BUND 2001a). Mit dem Ziel, die Gefahr für Menschen durch Salmonellen von lebensmittelliefernden Tieren zu verringern, wurde von der Europäischen Gemeinschaft die Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 erlassen (EG 2003). Auch die Bestimmungen der Hühnersalmonellenverordnung dienen der Kontrolle von Salmonelleninfektionen bestimmter Geflügelbestände (BUND 2001b). Der Mensch kann über humanadaptierte Serovare an Typhus und Paratyphus erkranken. Nicht wirtsadaptierte Serovare wie *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium* führen im Zuge einer mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftung zu Gastroenteritiden (SELBITZ 2007).

2.1.7 Staphylococcus

Zur Gattung *Staphylococcus* gehören grampositive kokkenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm, die einzeln, paarweise, traubenförmig oder unregelmäßig gelagert sind. Staphylokokken sind fakultative Anaerobier,

katalasepositiv und resistent gegen Bacitracin. *Staphylococcus* - Arten haben Bedeutung als Schleimhaut- und Hautparasiten bei Mensch und Tier und sind medizinisch als Eitererreger und Lebensmittelvergifter bedeutsam. Für die Anzucht eignet sich besonders Blutagar. Zur Abgrenzung von *Micrococcus* werden bevorzugt der anaerobe Glucoseabbau und die Furazolidonresistenz der Staphylokokken herangezogen. Virulenzfaktoren sind eine antiphagozytäre Schleimkapsel, eine Glykokalix, fibronectinbindende Proteine, das Protein A und der Clumping-Faktor. Der Nachweis der Koagulasereaktion mit Kaninchenplasma ist ebenso wie die Bestimmung des Clumping-Faktors für die Speziesdiagnostik wichtig. Als bedeutende Toxine sind die Enterotoxine A, B, C1-C3, D und E sowie die epidermiolytischen Exfoliativtoxine zu nennen. Außerdem werden Leukozidin, Hyaluronidase und viele verschiedene Hämolysine gebildet (SELBITZ 2007). Für Infektionen beim Geflügel ist v.a. *Staph. aureus*, seltener *Staph. hyicus* von Bedeutung. Diese treten endemisch oder sporadisch auf, als akute Septikämie oder in Form örtlich begrenzter entzündlich-regressiver Prozesse, wobei beide Erkrankungsformen ineinander übergehen können. Die Staphylokokkose kann dabei zu Embryosterblichkeit, Nabel- und Dottersackentzündungen, Arthritis und Synovitis, sowie Otitis – Osteomyelitis - Chondronecrosis besonders im proximalen Femurbereich und des Tibio-Metatarsus führen. Eine vaskuläre oder gangränisierende Dermatitis tritt ebenfalls auf. Insbesondere bei juvenilen Masthühnern und Puten werden ökonomisch bedeutsame Verluste mit einer Gesamtmortalität von 5 bis 20 % verursacht. Bei immunsuprimierten Tieren können auch Koagulase-negative Staphylokokken, wie z.B. *Staph. epidermidis*, Krankheitsprozesse verursachen (HINZ et al. 2005). Staphylokokken, v. a. *Staph. aureus*, sind beim Menschen wichtige Erreger von Infektionen und Intoxikationen und spielen als Verursacher von Lebensmittelintoxikationen und als Hospitalismuskeime eine Rolle. Methicillin – resistente *Staph. aureus* (MRSA) bereiten als multiresistente Keime besondere Probleme (SELBITZ 2007).

2.2 Antibiotika mit Bedeutung beim Wirtschaftsgeflügel

Seit der Entdeckung des Penicillins wurde eine Vielzahl weiterer antimikrobiell wirksamer Substanzen entdeckt. Dabei handelt es sich um verschiedene Stoffgruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Viele Antibiotika werden von Mikroorganismen selbst produziert, so z. B. das Penicillin vom Schimmelpilz *Penicillium notatum*. Heutzutage ist man jedoch bedingt auch in der Lage antimikrobielle Wirkstoffe synthetisch herzustellen. Je nach Wirkungsansatz und Struktur werden diese in unterschiedliche Stoffgruppen geordnet (BfT 1999, KROKER et al. 2002). Nach KROKER (2006) können Antibiotika, die von Pilzen oder Bakterien produziert werden, von Chemotherapeutika, die synthetisch hergestellt werden, unterschieden werden. Da Antibiotika häufig chemisch verändert werden (z.B. Aminopenicilline), wird zwischen beiden Gruppen nicht streng unterschieden, und zur Vereinfachung können beide Gruppen zu Antibiotika zusammengefasst werden (KROKER 2006). Im PSCHYREMBEL (2007) werden Antibiotika als antibakterielle Chemotherapeutika zur Therapie bakterieller Infektionen definiert. Sie können entweder das Wachstum von Bakterien hemmen, indem sie Stoffwechselvorgänge stören und somit eine bakteriostatische Wirkung entfalten oder die Keime durch Schädigung essentieller Strukturen töten, also bakterizid wirken (KROKER et al. 2002). Da gerade Geflügelbestände durch eine Vielzahl primär- und sekundärpathogener bakterieller Keime bedroht sind (HINZ et al. 2005), ist es wichtig geeignete Wirkstoffe zur kausalen Bekämpfung infektiöser Erkrankungen zur Verfügung zu haben. Wie in anderen Bereichen der Tiermedizin sind Antibiotika bislang auch in der Geflügelmedizin nicht zu ersetzen. Nur mit Hilfe von Antibiotika ist es derzeit möglich von bakteriellen Infektionserkrankungen betroffene Geflügelbestände wirkungsvoll zu behandeln. Alternative Maßnahmen zur Antibiose gibt es zwar, z. B. in Form von Stall- und Haltungshygiene, immunologischen Maßnahmen, wie Impfungen, oder dem Einsatz von probiotischen Mikroorganismen, jedoch sind deren Einsatzbereiche noch begrenzt und sie erreichen nicht den Wirkungsgrad der Antibiotika (WIELER 1999). Nach dem QS Tierarzneimittelkatalog Geflügel (QS 2008) gibt es in Deutschland derzeit über 20 verschiedene antibiotische Stoffe aus neun verschiedenen Wirkstoffgruppen, welche in der Geflügelmedizin verwendet werden dürfen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Auflistung von antibiotischen Wirkstoffen und Geflügelarten, für die in Deutschland nach Angaben von QS (2008) und VETIDATA (2008) Präparate zugelassenen sind.

Wirkstoff	Geflügelspezies
Amoxicillin	Huhn/ Hähnchen
Ampicillin	Huhn/ Hähnchen
Benzylpenicillin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Chlortetracyclin	Huhn/ Hähnchen (nach Vetidata generell für Geflügel zugelassen)
Colistin	Huhn/ Hähnchen
Danofloxacin	Huhn/ Hähnchen
Difloxacin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Enrofloxacin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Erythromycin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Lincomycin- Spectinomycin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Neomycin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Oxytetracyclin	Huhn/ Hähnchen, Pute, Ente
Phenoxymethylpenicillin-Kalium	Huhn/ Hähnchen
Spectinomycin	Huhn/ Hähnchen
Sulfadimethoxin	Huhn/ Hähnchen
Sulfadimidin	Huhn/ Hähnchen
Sulfaquinoxalin	Huhn/ Hähnchen, Pute (nach Vetidata auch für Gänse zugelassen)
Tetracyclin	Huhn/ Hähnchen (nach Vetidata generell für Geflügel zugelassen)
Tiamulin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Tilmicosin	Huhn/ Hähnchen
Trimethoprim-Sulfamethoxacol	Huhn/ Hähnchen
Tylosin	Huhn/ Hähnchen, Pute
Tylvalosin	Huhn/ Hähnchen (keine Angaben von Vetidata für Geflügel)

2.2.1 β -Lactame

Zur Gruppe der bakterizid wirkenden β -Laktameantibiotika gehören sowohl die Penicilline und Aminopenicilline als auch die Cephalosporine. Benannt ist diese Wirkstoffgruppe nach dem β -Lactam-Ring, welcher in der Struktur aller dazugehörigen Antibiotika vorkommt. Die in der Humanmedizin angewandten Carbapeneme und Monobactame spielen in der Tiermedizin bisher keine Rolle. Generell inhibieren alle β -Laktamantibiotika die Peptidoglykan- und Mureinsynthese der Zielzellen durch Beeinträchtigung der daran beteiligten Transpeptidasen und andere Enzyme. Die Transpeptidasen werden durch die Spaltung des β -Laktamringes acetyliert und inaktiviert. Neben dem osmotisch bedingten Zelltod bei

Störung der Mureinsynthese spielt auch die Bindung der β -Lactame an sogenannte Penicillin-bindende-Proteine (PBP) eine Rolle. Diese PBP beteiligen sich maßgeblich an der Zellteilung, so dass deren Beeinträchtigung zur Zelllysis führt. Da grampositive Bakterien mehr Murein in der Zellwand eingebaut haben, zeigen viele β -Lactame, v. a. Penicilline, eine bessere Wirkung gegen diese Bakteriengruppe als gegen gramnegative Bakterien. Zudem besitzen gramnegative Bakterien eine äußere Zellmembran, die selektiv auf die Permeabilität wirkt. Aminopenicilline und Cephalosporine können jedoch eine breite Wirkung gegen verschiedenste gramnegative und grampositive Bakterien zeigen. Intrazelluläre Erreger werden von β -Lactamen nicht erfasst (KROKER et al. 2002, KROKER 2006, YAO und MOELLERING 2007). Hinweise darauf, dass Penicilline in einigen Bakterien auch die RNA – Synthese hemmen könnten müssen erst noch weiter geprüft werden (YAO und MOELLERING 2007). Bakterien können Enzyme, sogenannte β -Lactamasen, synthetisieren, welche den β -Lactam-Ring angreifen und somit die Wirkung des Antibiotikums aufheben können. Die zu dieser Enzymgruppe gehörigen Penicillinasen lassen sich durch Clavulansäure hemmen (KROKER et al. 2002). Die Resorption der β -Lactame nach oraler Gabe variiert deutlich. So wird Amoxicillin eine bessere Verfügbarkeit nach oraler Gabe zugeschrieben als Ampicillin (KROKER et al. 2002, YAO und MOELLERING 2007). Penicillin zeigt seine Wirkung vorwiegend im grampositiven Keimspektrum, aber z.B. auch gegen *Pasteurella multocida*, dagegen ist u. a. *E. coli* aufgrund der Bildung von Penicillinasen resistent. Eine bessere Wirksamkeit gegen gramnegative Erreger entfalten die Aminopenicilline, so auch gegen *E. coli*, Salmonellen und andere. Resistent sind aber Klebsiellen und Pseudomonaden (KROKER 2006, YAO und MOELLERING 2007).

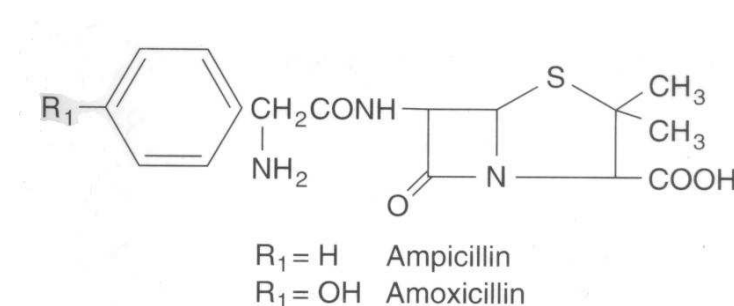


Abbildung 1: Struktur von Aminopenicillinen als Vertreter der β -Lactame
(KROKER et al. 2002)

β-Lactam-Antibiotika werden u. a. zur Behandlung von Erkrankungen durch grampositive Kokken, Listerien, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Avibacterium paragallinarum* und Clostridien verwendet (HINZ et al. 2005). Zur tierärztlichen Therapie beim Wirtschaftsgeflügel werden in Deutschland derzeit Amoxicillin und Ampicillin, sowie Benzylpenicillin und Phenoxymethylpenicillin-Kalium eingesetzt (KROKER 2006, QS 2008).

2.2.2 Aminoglykoside

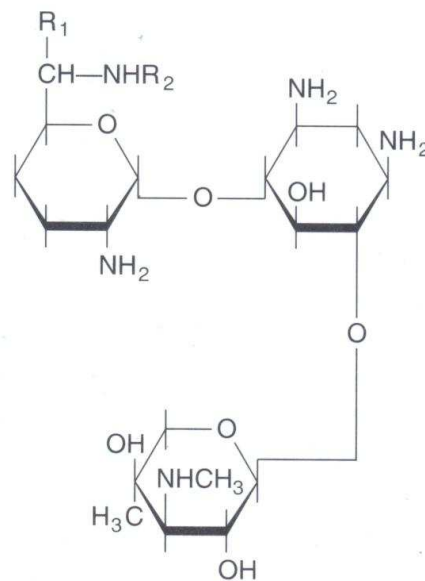


Abbildung 2: Struktur eines Aminoglykosidantibiotikums, hier Gentamycin (KROKER et al. 2002)

Seit im Jahre 1944 Streptomycin als erstes Aminoglykosidantibiotikum beschrieben worden ist, spielt diese Wirkstoffgruppe eine Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Erkrankungen, insbesondere durch gramnegative Erreger. Auch Streptomycin wird heute noch verwendet. Gewonnen werden Aminoglykoside aus Streptomyces- und Microspora-Arten. Aminoglykosidantibiotika sind bakterizid. Die chemische Struktur baut auf Aminosuktern auf, die über glykosidische Bindungen mit Hydroxylgruppen von amino- oder guaninsubstituierten Cyclohexanol verknüpft sind. Sie beeinflussen die Translokationsvorgänge im Verlauf der Proteinsynthese an der 30s-Untereinheit von Ribosomen derart, dass es zu Ablesefehlern und damit zur Bildung sogenannter „Nonsense“-Proteine kommt, die letztlich zum Zelltod führen. Dem breiten Wirkspektrum gehören hauptsächlich gramnegative Bakterien an, aber z. B. auch Staphylokokken reagieren häufig sensibel (KROKER et al. 2002). So besteht zum

Teil eine Wirksamkeit gegen *Staph. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (YAO und MOELLERING 2007). KROKER et al. (2002) warnen vor einer nephro- und ototoxischen Wirkung von Aminoglykosiden, zumal es bei eingeschränkter Nierenfunktion zu einer Akkumulation der Substanzen kommt. Für Neomycin wird aufgrund seiner Toxizität eine parenterale Anwendung abgelehnt. Nach oraler Gabe erfolgt kaum eine Resorption aus dem Darm, mit Ausnahme bei einer durch eine Enteritis geschädigten Mucosa (KROKER et al. 2002). KROKER (2006) geht davon aus, dass nach oraler Applikation keine therapeutischen Blutspiegel erreicht werden. Im Bereich des Wirtschaftsgeflügels finden noch Neomycin und Spectinomycin ihren Einsatz (QS 2008), z. B. bei der Behandlung von *E. coli*-Enteritiden (KROKER 2006).

2.2.3 Gyrasehemmer

Einige der wichtigsten und potentesten Antibiotika gehören der Gruppe der Gyrasehemmer oder (Fluor-)Chinolone an. Ein 4-Chinolon- oder ein strukturähnliches Naphtyridin- oder Pyridopyrimidingrundgerüst mit einer Carboxylgruppe in Position 6 ist ein gemeinsames Strukturmerkmal dieser Gruppe. Die schnelle Resistenzentwicklung über sogenannte Einstufenresistenzen früherer Vertreter wie Nalidixinsäure machte deren Einsatz schwierig. Die zweite Generation mit den Fluorchinolonen zeigt hierbei deutlich bessere Eigenschaften und zudem ein noch breiteres Wirkspektrum. Gyrasehemmer der Gruppen 3 und 4 finden vorerst nur in der Humanmedizin ihren Einsatz. Der Wirkmechanismus basiert auf der Hemmung des Enzyms Gyrase, einer Topoisomerase. Dieses Enzym kann eine Spaltung und die Wiederverbindung von DNA – Strängen vollführen und sorgt für die Überspiralisierung der ringförmigen bakteriellen DNA. Fluorchinolone binden an die Gyrase und hemmen den Wiederverschluss der DNA. Damit wird die DNA-Polymerasenreaktion in der Bakterienzelle verhindert. Auch andere Topoisomerasen werden gehemmt. Als Teil der bakteriziden Wirkung dieser Stoffgruppe wird jedoch zudem ein negativer Einfluss auf die bakterielle Zellwand vermutet. Das Wirkspektrum umfasst gramnegative Keime und grampositive Keime, Chlamydien und zum Teil Mykoplasmen und Anaerobier. Streptokokken und Enterokokken sind mäßig bis unempfindlich. Fluorchinolone sind auch wirksam gegen intrazelluläre Erreger (KROKER et al. 2002). Beim Geflügel können derzeit Danofloxacin, Difloxacin, und Enrofloxacin eingesetzt werden (QS 2008, VETIDATA 2008). Einsatz

finden Fluorchinolone u. a. bei der Behandlung von *Salmonella*-, *Pseudomonas*-, *Aeromonas*-, *Klebsiella*-, *Yersinia*- und *Riemerella*-Arten (HINZ et al. 2005).

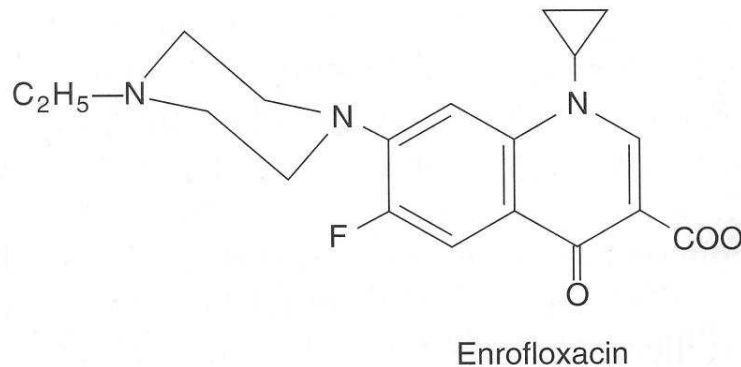


Abbildung 3: Struktur von Enrofloxacin (KROKER et al. 2002)

2.2.4 Polypeptidantibiotika

Die wichtigsten Vertreter der Polypeptidantibiotika sind die Polymyxine. Bei dieser Wirkstoffgruppe handelt es sich um verzweigte, zyklische Dekapeptide mit endständigen Amino- und Fettsäuren. Dadurch erhalten sie amphotere Eigenschaften. Aufgrund chemisch-physikalischer Inkompatibilitäten wird, über eine Reaktion mit Phospholipidkomponenten der Zellmembran, diese permeabel für essentielle Plasmabestandteile, wodurch es zu einer bakteriziden Wirkung bei gramnegativen Bakterien kommt (KROKER et al. 2002). Bei Anwesenheit von Calcium kann diese bakterizide Wirkung reduziert sein, da sich Calcium in die Bindung des Arzneimittels mit der Zellmembran einmischt (YAO und MOELLERING 2007). Aufgrund ihrer zytotoxischen und neurotoxischen Eigenschaften ist die systemische Verabreichung von Polymyxinen stark eingeschränkt (KROKER et al. 2002). Nach KROKER et al. (2002) erfolgt nach oraler Gabe nur eine geringe Resorption, die durch Mucosaläsionen begünstigt werden kann. Bei Wirtschaftsgeflügel kommt nur Colistin zur Anwendung (KROKER 2006, QS 2008). Eine Resistenzentwicklung ist chromosomal gebunden und tritt selten auf. Bei enteraler Verabreichung werden Polymyxine kaum resorbiert, was die Verwendung zur Behandlung bakterieller Enteritiden, z.B. ausgelöst durch Salmonellen oder *E. coli*, erlaubt (KROKER 2006).

2.2.5 Tetrazykline

Antibiotika aus dieser Gruppe werden von *Streptomyces* – Arten produziert und bestehen, wie aus der Bezeichnung Tetrazykline zu entnehmen ist, aus vier Sechseringen mit verschiedenen Substituenten. Tetrazykline sind gegen eine Reihe grampositiver und gramnegativer, aerober wie auch anaerober Erreger wirksam. Durch die Bindung an die 30s – Untereinheit der bakteriellen Ribosomen wird die Bindung von Aminoacyl-t-RNA an die Akzeptorregion der Ribosomen durch Tetrazykline gehemmt und somit die Proteinsynthese gestört. Dies führt zu einem bakteriostatischen Effekt (KROKER et al. 2002). Über spezifische Transportproteine gelangt der Wirkstoff in die Bakterienzelle und hemmt dort die Elongationsphase der Proteinsynthese. Tetrazykline zeigen eine Wirkung bei extrazellulär und intrazellulär gelagerten Keimen (KROKER 2006). Viele Erreger besitzen plasmidvermittelte Resistenzen. *Proteus spp.* und *Pseudomonas aeruginosa* sind primärresistent.

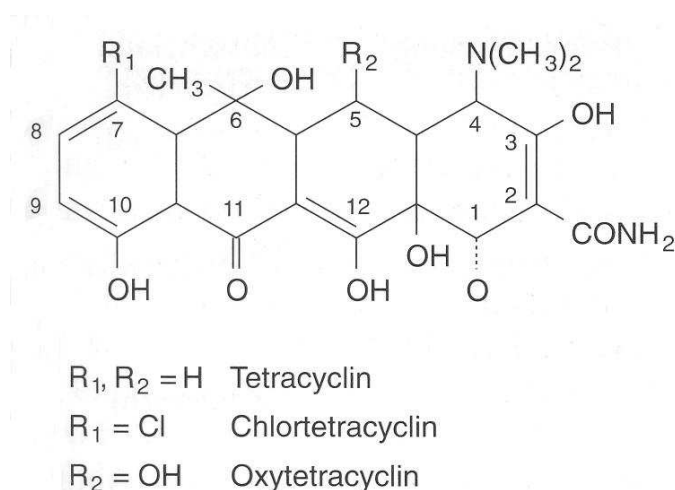


Abbildung 4: Struktur wichtiger Tetrazykline (KROKER et al. 2002)

Es treten auch Mehrfachresistenzen auf, wobei der Wirkstoff entweder aktiv wieder aus der Zelle entfernt oder bereits die Penetration in die Zelle herabgesetzt wird (KROKER et al. 2002). Dieser durch Tetrazykline selbstinduzierte Mechanismus führt generell zu Kreuzresistenzen innerhalb der Wirkstoffgruppe (KROKER 2006). KROKER (2006) sieht den therapeutischen Wert der Tetrazykline durch die weit verbreitete Resistenz eingeschränkt und empfiehlt deren Einsatz nur nach erfolgtem Nachweis der Erregersensitivität. Bei enteraler Applikation von Tetrazyklinen ist zu beachten, dass diese zusammen mit Kationen aus der Nahrung, z.B. Ca^{2+} - Ionen,

Chelate bilden können, wodurch es zu einer verminderten Resorption kommt (KROKER et al. 2002). Tiermedizinische Relevanz für die Behandlung von Geflügel besitzen Tetracyclin und Chlortetracyclin (QS 2008), z. B. bei der Behandlung von Enterokokken, Pasteurellen, Yersinien, *Avibacterium paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* und Chlamydien (HINZ et al. 2005).

2.2.6 Lincosamide

Lincosamide setzen sich aus der substituierten Aminosäure Prolin und einem schwefelhaltigen Aminozyklohexose-Galacto-Octapyranring zusammen. Durch ihre Bindung an die 50s - Untereinheit von Ribosomen stören sie die Aminoacyl-t-RNA-Bindung an die Polypeptidtransferase. Der Mechanismus spielt mit dem der Macrolid-Antibiotika zusammen, sodass auch vergleichbare Resistenzentwicklungen und Kreuzresistenzen zu beobachten sind. Das Wirkspektrum umfasst im Wesentlichen grampositive Bakterien, aber auch anaerobe gramnegative und Mykoplasmen. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Lincosamide und der damit verbundenen leichten Penetration von Membranen werden in vielen Geweben, wie Knochen, Weichteile, Haut, Lunge und Synovia, hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht (KROKER et al. 2002). Abhängig von der Konzentration und der Bakterienspezies entfalten Lincosamide eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung. Enterokokken sind resistent (YAO und MOELLERING 2007). Für die Behandlung von Wirtschaftsgeflügel steht derzeit nur Lincomycin als Kombinationspräparat mit Streptomycin zur Verfügung (QS 2008, VETIDATA 2008). Einsatzgebiete hierfür sind auch Infektionen mit Clostridien und *Bacillus cereus* (HINZ et al. 2005).

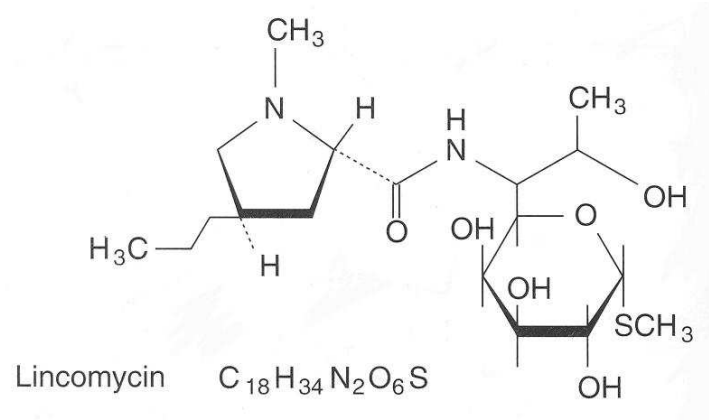


Abbildung 5: Struktur von Lincomycin (KROKER et al. 2002)

auch diejenige von Lincosamiden (KROKER et al. 2002). Für die Behandlung von Wirtschaftsgeflügel sind derzeit die Wirkstoffe Erythromycin, Tilmcosin und Tylosin erhältlich (QS 2008, VETIDATA 2008).

2.2.8 Sulfonamide und Trimethoprim

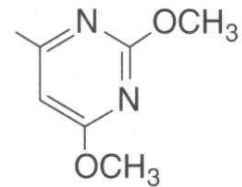
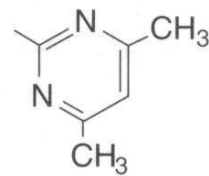


Abbildung 7: Struktur von Sulfonamiden (KROKER et al. 2002)



Sulfonamidgrundstruktur (li. o.), R1 von Sulfadimethoxin (re. o.), Sulfadimidin (re. 2. v. o.), Sulfamethoxazol (re. 2. v. u.), Sulfaquinoxalin (re. u.). R2 ist bei allen ein Wasserstoffatom (-H).

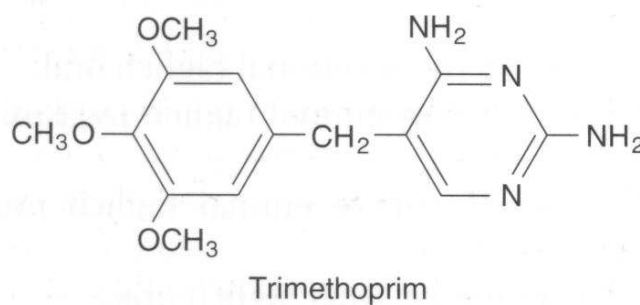
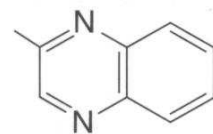
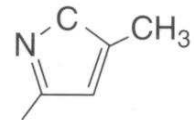


Abbildung 8: Struktur von Trimethoprim (KROKER et al. 2002)

Als Sulfonamide werden alle Amide aromatischer Sulfonsäuren bezeichnet. Es gibt eine Unzahl von synthetisierten Sulfonamid-Derivaten, wovon aber nur wenige medizinische Relevanz besitzen. Sulfonamide entfalten eine bakteriostatische Wirkung. Sie hemmen kompetitiv die Dihydropteroinsäure – Synthese aufgrund der Konkurrenz zur p-Aminobenzoessäure. Hierdurch wird die Synthese der bakteriellen Folsäure verhindert. Empfindlich sind jedoch nur proliferierende Bakterien, die ihre Folsäure selbst produzieren müssen. Daher sind Erreger mit der Fähigkeit der Aufnahme von Folsäure aus der Umgebung resistent. Auch tritt die Wirkung der Sulfonamide erst ein, wenn der Erreger den Vorrat an Folsäure aufgebraucht hat. Das Wirkspektrum von Sulfonamiden ist sehr groß und umfasst neben grampositiven und gramnegativen Bakterien auch Chlamydien und sogar Protozoen (KROKER et al. 2002). Für *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken wird üblicherweise eine Resistenz gegenüber Sulfonamiden beobachtet (YAO und MOELLERING 2007). Derzeit stehen zur Behandlung neben Monopräparaten mit Sulfadimethoxin, Sulfadimidin und Sulfaquinoxalin auch Kombinationspräparate aus Trimethoprim und Sulfamethoxacol zur Verfügung (QS 2008, VETIDATA 2008). Trimethoprim setzt im Anschluss an die Folsäuresynthese von Bakterien an und entfaltet ebenfalls eine bakteriostatische Wirkung. Es blockiert die Dihydrofolsäurereduktase und verhindert dadurch die Reduktion der Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure, welche für die bakterielle Nukleinsäuresynthese wichtig ist (KROKER et al. 2002). Trimethoprim ist wirksam gegen viele grampositive Kokken und die meisten gramnegativen Stäbchen. *Pseudomonas aeruginosa* ist jedoch resistent (YAO und MOELLERING 2007). Als Monopräparat spielt Trimethoprim bei der Behandlung von Geflügel keine Rolle.

2.2.9 Pleuromutilin-Antibiotika

Pleuromutiline sind semisynthetische Substanzen, deren bakteriostatische Wirkung darauf beruht, dass sie mit 50s-Untereinheit der Ribosomen interagieren und hierdurch die Proteinsynthese hemmen. Das Wirkspektrum umfasst grampositive und gramnegative Erreger, sowie Mykoplasmen. Pleuromutiline weisen bei oraler Gabe eine hohe Bioverfügbarkeit auf (KROKER et al. 2002). Vor allem zur Behandlung von Mykoplasmen beim Geflügel wird Tiamulin eingesetzt (QS 2008).

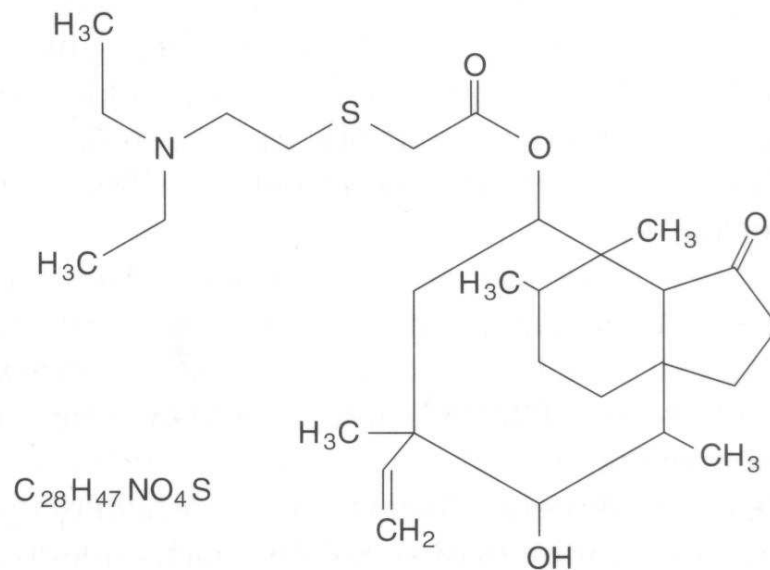


Abbildung 9: Struktur von Tiamulin (KROKER et al. 2002)

2.3 Bakterielle Resistenzen gegenüber antibiotischen Wirkstoffen

2.3.1 Resistenzentwicklung

Die Entwicklung von bakteriellen Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika tritt weltweit auf. Der Grund hierfür ist die enorme Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen. Resistenzentwicklung bedeutet, dass Bakterien, welche ursprünglich durch eine bestimmte Konzentration eines Wirkstoffes, der sogenannten minimalen Hemmkonzentration, am Wachstum gehindert werden, auf diese Konzentration nicht mehr reagieren. Ein Erreger ist letztlich resistent gegen einen Hemmstoff oder ein Antibiotikum, wenn bei Verwendung der zugelassenen Dosis, mit welcher sonst therapeutische Gewebe- oder Serumspiegel erreicht werden, ein Heilungserfolg nicht mehr erzielt wird, da die am Zielort erreichte Konzentration niedriger als die MHK des Erregers ist (KRÜGER 2002). Die minimale Hemmkonzentration, kurz MHK, eines Antibiotikums ist definiert als „die niedrigste Konzentration eines Chemotherapeutikums, bei der unter *in-vitro*-Bedingungen die Zellteilung in einer festgesetzten Zeitspanne verhindert wird“ (TROLLDENIER 2000), das heißt die Keimvermehrung im Kulturansatz wird noch verhindert (PSCHYREMBEL 2007). Bakterien verschiedener Spezies haben eine breite Vielfalt von Resistenzgenen gegen die Hemmung durch antibiotische Wirkstoffe entwickelt

(SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). KRÜGER und SEIDLER (2006) gehen davon aus, dass Mikroorganismen in der Lage sind, gegen nahezu jeden antibiotischen Wirkstoff Resistenzen zu entwickeln. Es wird zwischen Primärresistenzen und erworbenen Resistenzen unterschieden. Als Primärresistenzen oder natürliche Resistenzen bezeichnet man speziesspezifische Eigenschaften von Bakterien, welche ein Antibiotikum in einer bestimmten Bakterienart unwirksam sein lassen. Dagegen entstehen erworbene Resistenzen, auch Sekundärresistenzen genannt, durch ungerichtete, spontane Mutation unter Selektionsdruck oder durch die Aufnahme von Resistenzgenen in die Bakterienzelle durch Konjugation, Transduktion oder Transformation. Die Übergänge zwischen Primär- und Sekundärresistenzen sind zwar fließend, doch sind Primärresistenzen ausschließlich im Chromosom kodiert, während Sekundärresistenzen sowohl chromosomal als auch auf Plasmiden kodiert sein können. Dabei ist das Vorkommen sogenannter ruhender Gene möglich, welche erst exprimiert werden und dann zur Resistenz führen, sobald ein entsprechender Hemmstoff anwesend ist. Darauf beruhen auch „One step“ - Resistenzen (KRÜGER 2002). Im PSCHYREMBEL (2007) werden Ein-Schritt-Resistenzen als sehr schnell therapeutisch relevante, da in Folge nur eines Mutationsvorganges auftretende, Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen beschrieben. Diese kommen z.B. gegenüber Aminoglykosiden vor (KROKER 2006). Mehr-Schritt-Resistenzen werden als stufenweise zunehmende Folge mehrerer nacheinander stattfindender Mutationen gesehen (PSCHYREMBEL 2007). Substanzen wie β -Laktam – Antibiotika zeigen eine Resistenzentwicklung nach dem Mehr-Schritt-Typ (KROKER 2006). Auch Mehrfachresistenzen treten auf. Diese sind z.B. auf sogenannten Transposons kodiert. Diese Transposons können zwischen Plasmid und Chromosom hin und her hüpfen und bei der Konjugation übertragen werden. Dadurch besteht die Möglichkeit gleich mehrere Resistenzen innerhalb einer Bakterienpopulation zu verbreiten. (KROKER et al. 2002, KROKER 2006, KRÜGER und SEIDLER 2007). Solche Multidrug – Resistenzen sind besonders problematisch für die Therapie. Die betreffenden Bakterien werden entweder durch die Aufnahme vieler einzelner Resistenzgene oder durch eine gesteigerte Expression von Genen, die für Multidrug - Efflux – Pumpen kodieren, gegenüber verschiedenen Wirkstoffen resistent. NIKAIDO (2009) gibt einen ausführlichen Überblick über diese Problematik.

2.3.2 Resistenzmechanismen

2.3.2.1 Modifikation und Abbau des Antibiotikums

Bakterien sind sowohl in der Lage Chemotherapeutika abzubauen als auch diese so zu verändern, dass deren antibakterielle Wirkung verloren geht (KRÜGER und SEIDLER 2007). So können Enzyme, sog. β -Laktamasen, produziert werden, welche den β -Laktamring der entsprechenden Antibiotikagruppe zerstören. Die enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe durch β -Laktamasen ist der wichtigste Resistenzmechanismus gegen diese Antibiotika (Werckenthin und Schwarz 2003). Ähnliches geschieht bei der Spaltung des Lactonringes von Macrolid-Antibiotika. Durch Acetyl- und Adenyltransferasen oder Phosphorylasen werden NH_2 - und OH-Gruppen von Aminoglykosiden so modifiziert, dass deren Transport in die Bakterienzelle aufgrund veränderter Ladungsverhältnisse vermindert ist (KROKER et al. 2002, RICE und BONOMO 2007).

2.3.2.2 Änderung der Zielstruktur

Einen gängigen Mechanismus von Antibiotikaresistenzen stellt die Veränderung der Zielstrukturen von Wirkstoffen dar. Auf diese Weise verhindern die Mikroorganismen, dass Wirkstoffe an deren Zielstrukturen ansetzen und eine Wirkung entfalten können (KRÜGER und SEIDLER 2007). Eine Modifikation von PBP scheint der vorrangige Mechanismus der β -Laktam-Resistenz in grampositiven Bakterien zu sein (WERCKENTHIN und SCHWARZ 2003, RICE und BONOMO 2007). Zudem kann verhindert werden, dass Chemotherapeutika überhaupt erst in die Bakterienzelle gelangen, indem Porin-Proteine in der Zellmembran verändert werden und hierdurch der Weg versperrt wird, wie dies bei β -Laktam – Antibiotika auftritt (KROKER et al., 2002). Nach KROKER et al. (2002) und RICE und BONOMO (2007) werden durch eine enzymatische Methylierung des Bindungsortes am Ribosom diese unangreifbar für Macrolide, sowie auch für Lincosamide und Streptogramine. Auch der Resistenzmechanismus gegenüber Sulfonamiden betrifft die Zielstruktur. Jedoch erfolgt hier über eine erhöhte Synthese von p-Aminobenzoessäure eine kompetitive Antagonisierung der Sulfonamide. Auch eine Veränderung der Dihydropteroinsäure – Synthetase spielt aber bei der Resistenzentwicklung gegen Sulfonamide eine Rolle. Bei Fluorchinolonen wird eine verminderte Affinität der Gyrase neben einer Permeabilitätsveränderung der Zelle beschrieben (KROKER 2002). Polymyxin-

resistente Bakterien zeigen modifizierte Lipopolysaccharide (RICE und BONOMO 2007).

Tabelle 2: Beispiele für Resistenzmechanismen (RICE und BONOMO 2007)

Antibiotika	Art der Resistenz	Mechanismus	Beispiele
Aminoglykoside	Verringerte Aufnahme Enzymatische Modifikation	Permeabilitäts- änderung der äußeren Membran Phosphotransferase Adenyltransferase Acetyltransferase Bifunktionale Enzyme	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> gram +, gram – gram +, gram – gram +, gram – gram +, gram –
β-Laktame	Veränderte Zielstruktur Enzymatischer Abbau	Veränderte PBP β-Laktamasen	gram + Kokken gram –, gram +
Macrolide/ Lincosamide/ Streptogramin B	Veränderte Zielstruktur	Enzymatische Methylierung des aktiven Bereichs der Ribosomen → verringerte Bindung	gram +
Macrolide	Transport aus der Zelle	Effluxsystem (Pumpen)	gram + Kokken
Streptomycin	Enzymatischer Abbau	Acetyltransferasen	<i>Staph. aureus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Quinolone	Veränderte Zielstruktur Transport aus der Zelle Schutz der DNA Enzymatische Modifikation	Reduziert Bindung durch Mutation Effluxsystem Schutzprotein Acetyltransferase	gram –, gram + <i>Staph. aureus</i> Diverse <i>E. coli</i>
Tetracycline	Transport aus der Zelle Veränderte Zielstruktur	Effluxsystem Ribosomale Schutzproteine	gram +, gram – gram +
Sulfonamide	Veränderte Zielstruktur	Mutation/ Rekombination der Dihydropterinsäure-synthetase	gram +, gram –
Trimethoprim	Veränderte Zielstruktur Überproduktion der Zielstruktur	Veränderung der Dihydrofolsäure-Reduktase Überproduktion der Dihydrofolsäure-Reduktase	gram +, gram – <i>E. coli</i>

2.3.2.3 Aktive Entfernung des Wirkstoffes aus der Zelle

Über membranständige Transportsysteme können Antibiotika direkt aus der Zelle entfernt werden. Dieser Prozess ist jedoch energieabhängig und kann spezifisch nur für eine bestimmte Substanz oder eine Substanzklasse erfolgen. Bei einer chromosomal codierten Multi - Drug - Resistenz kann es zur gleichzeitigen Entfernung mehrerer Antibiotika kommen (KRÜGER und SEIDLER 2007). Tetracycline werden z.B. durch ein plasmidcodiertes Transportsystem aktiv aus der Zelle hinausbefördert. Auch Macrolide können energieabhängig aus der Bakterienzelle geschleust werden (KROKER et al. 2002). Durch eine vermehrte Ausschleusung von β -Lactamen durch Multi-Drug-Transporter wird keine vollständige klinische Unwirksamkeit hervorgerufen (WERCKENTHIN und SCHWARZ 2003).

2.3.3 Bedeutung des Antibiotikaeinsatzes für die Resistenzentwicklung

Laut GERMAP (2008) stieg der Verbrauch veterinärmedizinisch genutzter antimikrobieller Wirkstoffe zwischen 2003 und 2005 um 8,3% auf 784,4 Tonnen, wobei Tetracycline mit 44,6 % die am häufigsten verkauften Wirkstoffe waren, gefolgt von β -Lactamen, Sulfonamiden und Makroliden. Nach RICE und BONOMO (2007) ist das wachsende Problem antimikrobieller Resistenzen von Bakterien kein unerwartetes neues Phänomen in einer Umwelt, in welcher potente antimikrobielle Wirkstoffe eingesetzt werden. Eine vielfältige mikrobielle Welt und die relativ spezifischen Wirkungen von Antibiotika sichern die weite Verbreitung von Resistenzen unter Bakterien. Dabei ist das Auftreten von Antibiotikaresistenzen zwangsläufig an die Verwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen gebunden. Die Schnelligkeit und Vollständigkeit der Verbreitung von Resistenzgenen ist oft nicht vorhersehbar (RICE und BONOMO 2007). Es wird davon ausgegangen, dass der Gebrauch von Antibiotika in jedem Ökosystem zur Selektion resistenter Bakterien führt (WHO 1997). HELMUTH (1999) stellt fest, dass dies auch für den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in der Humanmedizin gilt. Besonders eine Langzeitexposition von nicht ausreichend hohen Wirkstoffkonzentrationen wird als resistenzselektierend angesehen (UNGEMACH 1999). Die WHO (2007) kommt zu dem Schluss, dass die verbreitete Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen sowohl für therapeutische Zwecke, als auch für die Prophylaxe und für das Ziel der Wachstumsförderung in der Tierproduktion, das Risiko für das Auftreten und die Verbreitung resistenter Mikroorganismen verstärkt hat. Für SCHWARZ und

CHASLUS-DANCLA (2001) zeigen die relativ kurzen Zeiträume zwischen der Einführung eines Antibiotikums zur klinischen Verwendung und dem Auftreten von Resistenzen, dass Bakterien es vermögen, sich schnell und effizient an Änderungen der Umweltbedingungen anzupassen, die durch die Verwendung von Antibiotika verursacht sind.

2.3.4 Bedeutung für Mensch und Tier

Die Entwicklung bakterieller Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen durch die Verwendung von Antibiotika in der Tiermedizin ist in erster Linie ein Problem für die weitere antibiotische Therapie von Tieren (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Sind die nach Arzneimittelrecht zugelassenen antibiotika-haltigen Medikamente gegen tierpathogene Keime nicht mehr ausreichend wirksam, so kann im besten Fall eine Umwidmung geeigneter Arzneimittel noch zum Therapieerfolg führen, sofern eine solche Umwidmung nach rechtlichen Maßgaben zulässig ist. § 56a ARZNEIMITTELGESETZ (2005) gibt genaue Vorgaben unter welchen Umständen und wie eine solche Umwidmung erfolgen kann. Gerade in der Klein- und Heimtiermedizin wird in solchen Fällen auch gerne auf Humanspezifikationen zurückgegriffen. Aber auch ohne eine direkte Anwendung von Humanmedikamenten am Tierpatienten werden sowohl im Klein- und Heimtierbereich als auch im Nutztierbereich große Mengen an Antibiotika eingesetzt, die zu den selben Wirkstoffgruppen zählen wie die meisten humanmedizinischen Antiinfektiva (UNGEMACH 1999). Die Entwicklung einer Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum aus einer Wirkstoffgruppe kann letztlich zu Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika dieser Gruppe und sogar Gruppen übergreifenden Resistenzen führen, wie dies u.a. von Makroliden und Lincosamiden bekannt ist (KROKER 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass Resistenzenentwicklungen aufgrund von Antibiotikaanwendung im Nutztierbereich zu Mikroorganismen führen können, gegen die auch Humanpräparate unwirksam sind. Schon seit längerem wird daher der Einsatz von Antibiotika besonders in der Nutztierhaltung als ein möglicher Faktor gesehen, der mit zur Ausbreitung bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika in der Humanmedizin beiträgt (UNGEMACH 1999). Für die Übertragung bakterieller Resistenzen vom Tier auf den Menschen sind verschiedene Wege möglich. Zum einen kann nach Selektion resistenter Keime bei behandelten Tieren ein Übergang zoonotischer Keime auf den Menschen durch

direkten Kontakt und kontaminierte Lebensmittel erfolgen (WIELER 1999) oder ein Austausch von Resistenzgenen mit humanpathogenen Keimen stattfinden. Zum anderen kann es durch Antibiotikarückstände in tierischen Lebensmitteln nach deren Verzehr zu einer Resistenzselektion humanpathogener Keime kommen (UNGEMACH 1999, SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Um das Risiko der bakteriellen Resistenzentwicklung für Mensch und Tier zu minimieren, wurden für die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen Vorgaben verfasst, die einen gewissenhaften Einsatz von Antibiotika gewährleisten sollen (BTK ArgeVET 2000, BfT 1999). Dabei ist das zentrale Anliegen dieser Werke ein alleiniger Einsatz von Antibiotika bei nachgewiesenem, sensiblen Erreger. Eine prophylaktische Antibiotikagabe wird entsprechend auf wenige Ausnahmen beschränkt. Des Weiteren wird die Resistenz- oder Empfindlichkeitstestung bakterieller Keime als wichtiges Kriterium zur Auswahl des geeigneten Wirkstoffes und zur Vermeidung therapieresistenter Keime herangezogen. RICE und BONOMO (2007) sehen eine besondere Verantwortung bei Einrichtungen in verschiedenen Ländern, welche, unter Beachtung von *in-vitro*-Empfindlichkeit, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, Standards und Grenzwerte für die Einteilung von neuen antimikrobiellen Wirkstoffen in sensibel, intermediär und resistent setzen. Die WHO (1997) geht schon lange davon aus, dass Bakterien und Gene, einschließlich Resistenzgenen, zwischen Menschen, Tieren und anderen Ökosystemen überspringen können. Als ungünstige Folgen der Selektion resistenter Bakterien bei Tieren werden

- ein gesteigertes Vorkommen resistenter Bakterien bei Tieren
- der Übertritt resistenter Pathogene auf Menschen bei direktem Tierkontakt oder bei Konsum von kontaminiertem Essen oder Wasser
- der Transfer von Resistenzgenen auf Bakterien des Menschen
- ein Anstieg der durch resistente Keime ausgelösten Infektionen beim Menschen
- und mögliche therapeutische Misserfolge bei Tieren und Menschen

angesehen (WHO 1997).

Da für die Zukunft nicht mit einer Vielzahl neuer Wirkstoffe für die veterinärmedizinische Nutzung zu rechnen ist, kommt dem Erhalt der Wirksamkeit der derzeit für die Veterinärmedizin verfügbaren Wirkstoffe eine besondere Bedeutung zu. Dies kann nur durch restriktiven und verantwortungsvollen Einsatz der Wirkstoffe sichergestellt werden (GERMAP 2008).

2.3.5 Monitoring antibiotischer Resistenzen beim Geflügel

Die WHO (2001) fordert im Rahmen einer globalen Strategie zur Abwehr von antimikrobiellen Resistenzen die Länder auf, nationale Monitoring Programme über die Verwendung von antibiotischen Mitteln bei lebensmittelliefernden Tieren zu etablieren, ein Kontrollsystem für Antibiotika einzuführen, Daten über die Menge der Antibiotika zu sammeln und die Daten über die Verwendung von antibiotischen Wirkstoffen mit Daten zu antibiotischen Resistenzen zu verknüpfen. Erst 2008 wurde in Deutschland ein umfassender Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin erstellt (GERMAP 2008), wie er in ähnlicher Form z. B. in Dänemark schon 1995 eingeführt worden ist und jährlich herausgegeben wird (DANMAP 2007). Bereits seit 2001 führt das BVL in Deutschland ein nationales Resistenzmonitoring pathogener Bakterien von lebensmittelliefernden Tieren durch (WALLMANN et al. 2001). Dabei spielen auch geflügelpathogene Keime eine wichtige Rolle (WALLMANN et al. 2007). Schon zuvor haben sich verschiedene Institutionen mit der Resistenzsituation beim Geflügel in Deutschland beschäftigt (GERLACH 1988, GERLACH 1990, KLARMANN 1996, TROLLDENIER 1995, TROLLDENIER 1996, TROLLDENIER 1999). Anhand deren Ergebnisse kann nur für *E. coli* die Resistenzentwicklung seit Ende der achtziger Jahre relativ lückenlos nachvollzogen werden (Tabelle 3). Für weitere Bakterien liefern diese Quellen kein kontinuierliches Datenmaterial. SCHMIED (2007) hat die *in-vitro*-Empfindlichkeit von ausgewählten Bakterien bei Legehennen untersucht. Dabei zeigte *E. coli* gegenüber Colistin, Enrofloxacin und Neomycin in über 95 % der Fälle eine Sensibilität. Eine Wirkung von Ampicillin war dagegen nur bei der Hälfte aller Isolate festzustellen. Bei Spectinomycin lag der Anteil der sensiblen *E. coli* bei 76,4 %. Der Anteil sensibler *Enterococcus faecalis/faecium*-Stämme lag für Ampicillin bei 100 und 94,5 %, für Enrofloxacin bei 94,8 und 47,5 % und für Erythromycin bei 21,6 und 29,0 %, abhängig von der Haltungsweise der Hennen. SCHMIED (2007) zeigt, dass sich das Resistenzverhalten auch abhängig von der Haltungsform signifikant unterscheiden kann. WALLMANN et al. (2007) stellte fest, dass *Staph. aureus* beim Geflügel gegenüber Ampicillin zu 52,4 %, gegenüber Penicillin G zu 54,8 %, gegenüber Erythromycin zu 46,4 % und gegenüber Tetracyclin zu 62 % resistent waren.

Tabelle 3: Resistenzentwicklung von *E. coli* (Anteile der sensiblen Isolate in %)

[illegible]

Salmonellen wiesen eine Resistenzrate von 29,4 % gegenüber Ampicillin und von 20,6 % gegenüber Tetracyclin auf. Gegenüber Enrofloxacin lag der Anteil resistenter Salmonellen bei 7,4 % und gegenüber SXT bei 11,8 %. *Pseudomonas aeruginosa* zeichnete sich überwiegend als sehr resistent aus. 72 % der Isolate waren gegenüber Enrofloxacin intermediär. Sowohl SCHMIED (2007) als auch WALLMANN et. al (2007) untersuchten die Empfindlichkeit der Bakterien mittels MHK-Bestimmung.

2.4 *In-vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung bakterieller Keime

Eine wichtige Aufgabe von mikrobiologischen Laboren ist die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung zur Verwendung bei der Behandlung infektiöser Erkrankungen (MOSER 2000). Die Geschichte der Entwicklung geeigneter Prüfmethode erstreckt sich bereits von den zwanziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts, mit den ersten Versuchen Flemings, über die 50`er mit den Anfängen der Standardisierung von Techniken, bis hin zur heutigen Zeit, in der neue Methoden z.B. zur Genotypisierung resistenter Keime zur Verfügung stehen (WHEAT 2001). Zur Bestimmung der *in-vitro*-Empfindlichkeit gibt es verschiedene Methoden: Agardiffusionstest, E-Test sowie Reihenverdünnungstests, wie die Bouillon-Mikrodilution oder die Agardilution. Diese Verfahren unterscheiden sich in Bezug auf die mit ihnen erarbeiteten qualitativen oder quantitativen Daten, aber auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie anwendungsorientierter Parameter (SCHWARZ et al. 2003, SCHWARZ et al. 2005). Die konventionellen Methoden geben die phänotypischen Eigenschaften eines Isolates unabhängig vom Vorhandensein oder der Art von Resistenzmechanismen wieder und sind daher unspezifisch. Dennoch wird für das mikrobiologisch-diagnostische Labor diese Art der Diagnostik noch auf längere Zeit unverzichtbar bleiben (SPENCKER 1999), auch wenn zur Erlangung spezieller Informationen das Augenmerk bereits auf genetische Methoden, wie PCR und DNA Sequenzierung u. a. (SCHWARZ und WERCKENTHIN 1999, GUERRA et al. 2003), gelegt wird, und heute eine ganze Reihe von Resistenzgenen nachgewiesen werden können (RASHEED et al 2007), wozu auch schon Microarray – Systeme angewendet werden können (PALKA-SANTINI 2007). Um praxisrelevante Ergebnisse aus *in-vitro*-Empfindlichkeitstests von isolierten Bakterien zu erhalten, müssen valide klinische Grenzwerte vorhanden sein (SCHWARZ et al. 2005). Für die Empfindlichkeitsbeurteilung aerober bakterieller Isolate liegen aber derzeit nur für Enrofloxacin geflügelspezifische Grenzwerte vor,

deren Gültigkeit sich zudem auf *Escherichia coli* und *Pasteurella multocida* bei Huhn und Pute beschränkt (NCCLS 2004).

2.4.1 Agardiffusionstest

Beim Agardiffusionstest diffundiert der Wirkstoff aus einem mit definierter Wirkstoffmenge bestücktem Plättchen in den Nährboden, wo sich ein Wirkstoffgradient um das Plättchen herum ausbildet. Der untersuchte bakterielle Erreger wird in Abhängigkeit von seiner Empfindlichkeit in einem unterschiedlich großen Bereich um das Plättchen herum am Wachstum gehindert. Diesen Bereich bezeichnet man als Hemmhof. Je nach Größe des HDD wird eine qualitative Einteilung der Bakterien in „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ vorgenommen (SCHWARZ et al. 2003). Der einzige konstante Parameter, abgesehen von der Technik des Tests, ist der Antibiotikagehalt der Plättchen (KRASEMANN und HILDENBRAND 1980). SCHWARZ et al. (2005) sehen in dem, in der Vergangenheit am häufigsten angewandten, Agardiffusionstest ein suboptimales Testsystem, das nicht die Anforderungen erfüllt, die sich aus den Antibiotikaleitlinien (BTK ArgeVET, 2000) für ein Antibiogramm ergeben.



Abbildung 10: Agardiffusionstest mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Die Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der DVG spricht sich trotz finanzieller und durchführungstechnischer Vorteile für einen Ersatz des Agardiffusionstests durch Bouillon-Mikrodilutionstests aus (LUHOFER et al. 2004). Als Hauptgrund hierfür wird

die fehlende quantitative Empfindlichkeitsbestimmung im Gegensatz zu Methoden wie dem Epsilon- und dem Reihenverdünnungstest angeführt (SCHWARZ et al. 2005). Auch die WHO (1997) fordert standardisierte Labormethoden für das Resistenzmonitoring, welche quantitative Daten für die Analyse liefern. Da der Agardiffusionstest mit geringem Aufwand durchzuführen und preisgünstig ist und damit zudem relativ schnell ein Übersichtsergebnis erzielt wird, hat sich diese Methode weltweit durchgesetzt (ALTREUTHER et al. 1997).

2.4.2 Bouillon-Dilutionstest/Reihenverdünnungstest

Wie SCHWARZ et al. (2003) zusammenfassen, können Reihenverdünnungstests unter Verwendung flüssiger Medien in Röhrchen (Makrodilution) und Mikrotiterplatten (Mikrodilution), sowie mittels fester Medien als Agardilution durchgeführt werden. Eine festgesetzte Menge an Bakterien wird in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des betreffenden Wirkstoffs inkubiert. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration bezeichnet, bei welcher kein sichtbares Wachstum der Bakterien mehr feststellbar ist.

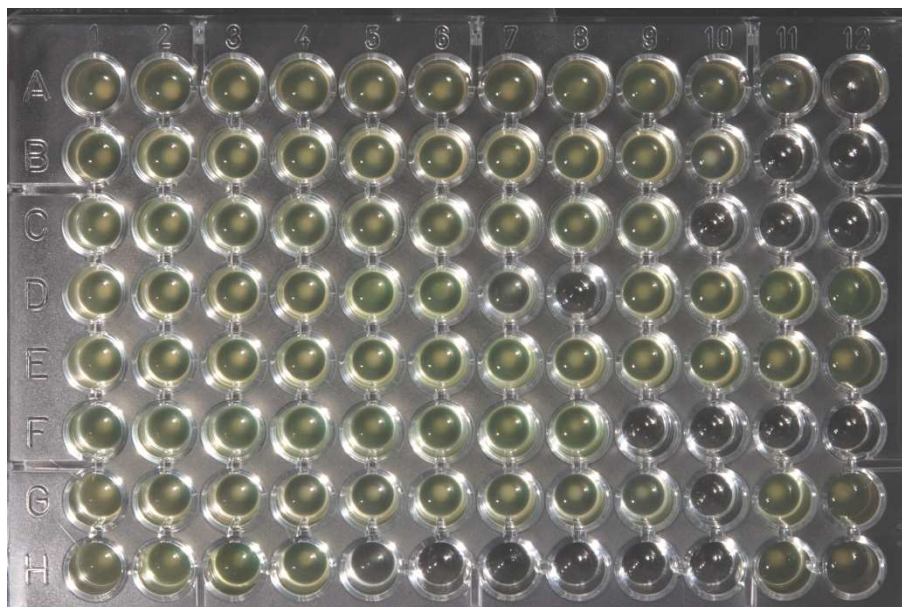


Abbildung 11: Mikrotiterplatte bei der Bouillon-Mikrodilution mit *Pseudomonas aeruginosa*

Als Grad für die Empfindlichkeit von Bakterien liefern Reihenverdünnungsverfahren ein quantitatives Ergebnis, welches auch den Vergleich von Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe behandelter Individuen zulässt. In der Routinediagnostik am

einfachsten zu handhaben sind Mikrodilutionsverfahren, da es hierfür bereits kommerziell erhältliche Mikrotiterplatten gibt (SCHWARZ et al. 2003). Von Seiten der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der DVG gibt es Bestrebungen, trotz fehlender geflügelspezifischer Daten, die bereits vorhandenen DVG-Vorgaben für die Bouillon-Mikrodilution auch auf den Geflügelbereich zu übertragen und ein entsprechendes Layout mit allen nötigen Antibiotika für eine Mikrotiterplatte zu entwickeln. Die Arbeitsgruppe schlägt vor, mindestens drei Konzentrationsstufen pro Wirkstoff zu testen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (LUHOFFER et al. 2004, SCHWARZ et al. 2005). SCHWARZ et al. (2003) sehen einen Vorteil der MHK-Bestimmung darin, dass der Tierarzt bei Kenntnis des MHK-Wertes und unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Parameter auch bei fehlenden Bewertungskriterien abschätzen kann, ob bei der Verwendung des entsprechenden Präparates die zur Bekämpfung des Erregers notwendige Wirkstoffkonzentration ausreichend lange erreicht wird. Die Bouillon-Mikrodilutionsmethode hat ihre Leistung und Vorzüge bereits bei einem deutschlandweiten Ringversuch mit über 30 teilnehmenden Laboren aufgezeigt (WALLMANN et al. 2005). Für die Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der DVG gilt die Mikrodilutionsmethode als Methode der Wahl für die Empfindlichkeitsprüfung (SCHWARZ et al. 2003).

2.4.3 Epsilon-Test (E-Test)

ALTREUTHER et al. (1997) sehen im Epsilon-Test (E-Test) eine Kombination aus Agardiffusionstest und MHK-Wertbestimmung. Die Wirkstoffträger aus Kunststoffstreifen enthalten einen Wirkstoffgradienten, d.h. eine aufsteigende Chemotherapeutikakonzentration. In Anlehnung zum Agardiffusionstest wird der Streifen auf eine beimpfte Agarplatte aufgelegt. Nach Ausbildung eines Hemmhofes bei sensiblen Keimen kann am Schnittpunkt des ellipsoiden Hemmhofes mit dem Teststreifen anhand einer aufgedruckten Skala der MHK-Wert abgelesen werden (ALTREUTHER et al. 1997). Für ALTREUTHER et al. (1997) ist der E-Test ein robustes Verfahren, dessen Ergebnisse auch bei nicht optimal standardisierten Parametern, wie z.B. die Inokulumsdichte, relativ gut reproduzierbar sind, und womit auch langsam wachsende Keime und Anaerobier zuverlässig getestet werden können. Probleme für den Einsatz des E-Tests als internationale Standardmethode werden dagegen in den Kosten, sowie im fehlenden Angebot von

veterinärmedizinisch eingesetzten Chemotherapeutika vermutet (ALTREUTHER et al. 1997).

2.4.4 Vergleichbarkeit der Methoden

Von Anfang an gab es Diskussionen über die Zuverlässigkeit und die Interpretation des Agardiffusionstests. Es wurde bald erkannt, dass methodische Faktoren wie Art und Dicke des Agars, die Papierqualität der Plättchen, deren Menge an Antibiotika, die Dichte des Inokulums und die Inkubationszeit standardisiert werden sollten (KRASEMANN und HILDENBRAND 1980). Nach KRASEMANN und HILDENBRAND (1980) ist der Wert von Regressionslinien zur Herstellung einer Beziehung zwischen den Ergebnissen von Agardiffusionstest und MHK reduziert, da zum einen die Reaktionen von biologischem Material testabhängig variieren und zum anderen bakterielle Stämme recht unterschiedlich sind, obwohl sie der selben Art angehören. Hinzu kommt das Nichteinhalten mathematischer Prinzipien bei der Berechnung von Regressionslinien (KRASEMANN und HILDENBRAND 1980). Laut ALTREUTHER et al. (1997) weisen die im E-Test ermittelten MHK – Werte eine enge Korrelation mit den durch klassische Dilutionsmethoden erzielten Werten auf.

Tabelle 4: Vergleichende Einordnung der Ergebnisse von Agardiffusionstest und MHK-Bestimmung nach TURNIDGE et al. (2007)

		<i>Agardiffusionstest</i>		
		resistent	intermediär	sensibel
<i>MHK-Bestimmung</i>	resistent	Übereinstimmung (resistent)	<u>minor error</u>	<u>very major error</u>
	intermediär	<u>minor error</u>	Übereinstimmung (intermediär)	<u>minor error</u>
	sensibel	<u>major error</u>	<u>minor error</u>	Übereinstimmung (sensibel)

TURNIDGE et al. (2007) vergleichen die Ergebnisse aus Agardiffusion und ermittelte MHK – Werte (Tabelle 4). Wird die Empfindlichkeit eines Isolates anhand der Ergebnisse eines Tests als intermediär, auf Basis eines anderen Tests jedoch als sensibel oder resistent eingeordnet, so bezeichnet man dies als einen „geringen

Fehler“ (minor error). Ein „großer Fehler“ (major error) liegt dagegen vor, wenn das Ergebnis des Agardiffusionstests „resistent“ und das der MHK-Bestimmung „sensibel“ lautet. Ist das Ergebnis in der Agardiffusion sensibel und in der MHK – Bestimmung resistent, so liegt ein „sehr großer Fehler“ (very major error) vor. Diese Beurteilung beruht auf der Annahme, dass der MHK-Wert als der verlässlichere Wert angesehen wird (SCHWARZ et al. 2003). ROCKSIN (2005) sieht in ihrer Arbeit, nach Vergleich von Ergebnissen aus Empfindlichkeitsprüfungen klinischer Isolate mittels Agardiffusionsverfahren und paralleler Testung mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren, die Korrelation solcher Werte bestätigt, wobei die Fehlerquoten bei den größtmöglichen Fehlern unter 10% lagen. Eine weitgehende Vergleichbarkeit wird auch von KRÜGER und SEIDLER (2007) angenommen.

2.4.5 Durchführungsvorschriften und Grenzwerte

Nach TURNIDGE et al. (2007) beruht die Erstellung von Grenzwerten (breakpoints) darauf, dass die MHK für sensible Pathogene im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten vom Wirkstoffspiegel, über das Verabreichungsintervall hinweg, übertroffen werden kann. Hinzu kommen Beobachtungen der Pharmakodynamik, d.h. ob es sich um zeit- oder konzentrationsabhängige Wirkstoffe handelt. Durch Testung einer großen Anzahl von Stämmen sowohl mittels Dilutions- als auch Agardiffusionstest verschiedener Spezies lassen sich mit einer linearen Regressionsformel entsprechende HHD – Werte für die Agardiffusion abschätzen (JORGENSEN und TURNIDGE 2007, KRASEMANN und HILDENBRAND 1980, TURNIDGE et al. 2007). Die Durchführung der *in-vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen von Bakterien kann unabhängig von der gewählten Methode grundsätzlich nach unterschiedlichen international anerkannten Durchführungsvorschriften erfolgen (SCHWARZ et al. 2003). Zu den international bedeutenden Vorschriften gehören Vorgaben des Deutschen Institutes für Normung (DIN 1989, DIN 2000a, DIN 2000b), des US amerikanischen Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS 2002, NCCLS 2004), sowie Vorschriften der British Society for Antimicrobial Chemotherapie (ANDREWS 2001a, ANDREWS 2001b) und des französischen Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2008a, CA-SFM 2008b). Bezüglich ihrer Vorgaben und der festgelegten Grenzwerte unterscheiden sich diese Durchführungsvorschriften zum Teil wesentlich. Abweichungen von Vorgaben zu Nährmedien, Inokulumsdichte,

Inkubationstemperatur und -zeit, Unterschiedliche in der Wirkstoffkonzentrationen oder der verwendeten Referenzstämme erlauben keine Festlegung universeller Grenzwerte (SCHWARZ et al. 2003). Das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, versammelt durch die European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), stellt Regeln zur Durchführung von Resistenztests mit dem Ziel zur Verfügung, Grenzwerte zu vereinheitlichen (EUCAST 2008). Viele Vorgaben dieser Institutionen sind auf humanmedizinische Problemstellungen ausgerichtet. Nur die CLSI-Vorgaben bieten schon seit längerer Zeit Leitlinien zur Durchführung und Grenzwerte zur Auswertung bakterieller Empfindlichkeitstests mit tiermedizinischen Indikationen an (NCCLS 2002). Tabelle 5 führt die Wirkstoffe und tiermedizinischen Indikationen auf, für welche CLSI – Vorgaben zur Verfügung stehen. Neuerdings gibt es auch von der CA-SFM Vorgaben und Grenzwerte für die Resistenztestung bakterieller Infektionserreger von Tieren (CA-SFM 2008b). Aber auch diese beiden Vorschriften liefern nicht für alle tiermedizinischen Indikationen Tierart- und bakterienspezifische Grenzwerte zur Empfindlichkeitsprüfung. Der Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) hat eine eigene Richtlinie zur Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien veröffentlicht, die auf der DIN Norm 58940 basiert (AVID 1998). Zudem wurde eine Zusammenstellung von Grenzwerten erarbeitet und aktualisiert (AVID 1997, AVID 1999), worin Grenzwertvorgaben aus verschiedenen Quellen enthalten sind, welche die meisten in der Tiermedizin verwendeten antibiotischen Wirkstoffe im Resistenztest abdecken. Eine Allgemeingültigkeit von Grenzwerten ist jedoch nicht gegeben (SCHWARZ et al. 2003). Die Einordnung getesteter Erreger in die Bewertungsstufen „empfindlich“, „intermediär“ oder „resistent“ ist nur mit sogenannten Grenzwerten (breakpoints) möglich. Diese sind aber keine direkt messbaren und nachweisbaren Werte, sondern müssen aus den Ergebnissen aufwendiger und teurer Untersuchungen abgeleitet werden (BÖTTNER et al. 2000). Nach KIETZMANN et al. (2004) müssen zur Festlegung von sog. „breakpoints“ mikrobiologische Kriterien, chemisch-physikalische Eigenschaften des Antibiotikums, dessen pharmako-kinetisches und toxikologisches Profil sowie klinische Kenntnisse berücksichtigt werden. Dabei werden konzentrationsabhängig wirksame Antibiotika, wie Fluorchinolone und Aminoglykoside, von zeitabhängig wirksamen Antibiotika unterschieden. Während bei konzentrationsabhängigen Wirkstoffen die Frage nach

der notwendigen und erreichbaren Spitzenkonzentration im Zielgewebe im Vordergrund steht, ist bei zeitabhängigen Antibiotika die Zeitspanne von besonderer Bedeutung, für welche eine erreichbare Konzentration im Zielgewebe aufrecht erhalten werden muss (KIETZMANN et al. 2004). Für BÖTTNER et al. (2000) ergeben sich für die Verwendung von Grenzwerten einige Probleme. Zum einen sind Grenzwerte zwar für einen Wirkstoff festzulegen, gelten aber nur für das pharmazeutische Produkt mit einem entsprechenden Applikations- und Dosierungsschema bei bestimmten Indikationen und Tierarten. Zum anderen gibt es keine ausreichenden veterinärmedizinischen Daten, so dass Empfindlichkeitsbeurteilungen tierpathogener Erreger häufig anhand humanmedizinischer Grenzwerte erfolgen. Eine derart ungeprüfte Übertragung der Grenzwerte halten ALTREUTHER et al. (1997) und BÖTTNER et al. (2000) angesichts der Unterschiede von Tier und Mensch im Erregerspektrum, sowie in der Verteilung und des Stoffwechsels von Antibiotika und sogar aufgrund tierartspezifischen Differenzen in der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik, für wissenschaftlich nicht vertretbar. Nach BÖTTNER et al. (2000) müssen zur Grenzwertfestlegung für jede einzelne Tierart Angaben über Blut- und Plasmaspiegel, Verteilungsvolumen und über die Wirkstoffkonzentrationen in Körperflüssigkeiten und Zielorganen sowie -geweben für die angegebene Dosis und Dosierungsintervalle gemacht werden. Weiter bezweifelt BÖTTNER et al. (2000) den Nutzen einer „intermediären“ Bewertungsstufe, die in der Humanmedizin durch die Anwendung höherer nichttoxischer Dosierungen entstanden ist. Gerade bei der Behandlung lebensmittelliefernder Tiere ist aus Gründen der Wartezeit eine höhere Dosierung problematisch, und damit eine sichere Erfassung von als intermediär bewerteten Erregern nicht sicher. Daher sollte eine Therapie von intermediär beurteilten Erregern mit den getesteten Wirkstoffen in der Veterinärmedizin unterlassen werden (AVID 1998). In den Fällen, in welchen keine spezifischen Grenzwerte für bestimmte Wirkstoffe oder entsprechende Indikationen vorhanden sind, kann statt einer Einteilung in „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ die Verteilung der MHK-Werte, z.B. als MHK_{90} , zur Einschätzung der Empfindlichkeit getesteter Bakterien herangezogen werden (WALLMANN et al. 2003, WALLMANN et al. 2007). Für den therapeutischen Einsatz von Antibiotika wird jedoch der Empfindlichkeitsnachweis eines Erregers gefordert (BTK ArgeVET 2000). Die Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der DVG sieht die Bestimmung der MHK für

verlässlicher an als die Ergebnisse des Agardiffusionstests (SCHWARZ et al. 2003). SCHWARZ et al. (2003) sehen aber in der Erarbeitung valider veterinärspezifischer Grenzwerte eine der wichtigsten Aufgaben.

Tabelle 5: Wirkstoffe und tiermedizinisch relevante Indikationen, wofür Grenzwerte nach CLSI (NCCLS 2004) vorhanden sind

Antibiotikum	Tierart	Indikation
Spectinomycin	Rind	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somni</i>
Ampicillin	Keine Angaben	<i>Enterobacteriaceae</i> Staphylokokken Streptokokken Listerien Enterokokken
Penicillin	Keine Angaben	Staphylokokken Streptokokken Listerien Enterokokken
Enrofloxacin	Hühner u. Puten Katzen u. Hunde Rind	<i>Pasteurella multocida</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacteriaceae</i> Staphylokokken u. a. Organismen <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somnus</i>
Clindamycin	Hühner Hunde	<i>Clostridium perfringens</i> Staphylokokken
Erythromycin	Keine Angaben	Enterokokken Staphylokokken Streptokokken
Tilmicosin	Rind Schwein	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i>
Tiamulin	Schwein	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	Keine Angaben	<i>Streptococcus pneumoniae</i> u. a. außer Streptokokken
Tetracycline	Keine Angaben	<i>Streptococcus pneumoniae</i> u. a. außer Streptokokken

Geflügelspezifische Grenzwerte für die *in-vitro*-Empfindlichkeitstestung aerober Bakterien gibt es derzeit nur für Enrofloxacin zur Behandlung von *Pasteurella*

multocida und *E. coli* bei Huhn und Pute (NCCLS 2002, NCCLS 2004), so dass hier auch auf Grenzwerte aus anderen tiermedizinischen Bereichen sowie aus der Humanmedizin zurückgegriffen wird (Schwarz et al. 2006). Auch durch die zwischenzeitlich herausgegebene Neuauflage der CLSI-Standards (CLSI 2008) hat dieser Sachverhalt keine Änderung erfahren. Nach WERCKENTHIN und SCHWARZ (2003) ergibt sich durch die Ausbildung von Kreuzresistenten zwischen Substanzen der gleichen oder auch unterschiedlichen Wirkstoffgruppen die Möglichkeit, eine stellvertretende Testung sogenannter Leitsubstanzen durchzuführen. Aus der beobachteten Resistenz eines Erregers gegenüber dem getesteten Wirkstoff lassen sich danach Rückschlüsse auf die Resistenz gegenüber anderen Wirkstoffen ziehen. Daher besteht keine Notwendigkeit, alle verfügbaren Wirkstoffe zu testen, denn die Anzahl der zu testenden Wirkstoffe wird durch Verwendung von Stellvertretersubstanzen verringert (LUHOFFER 2004). Zudem kann durch die Wirksamkeitsprüfung von Leitsubstanzen die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber antibiotischen Substanzen verschiedener Gruppen beurteilt werden, auch wenn für diese Wirkstoffe keine spezifischen Grenzwerte vorhanden sind (NCCLS 2004).

Tabelle 6: Stellvertretersubstanzen für diverse Wirkstoffgruppen:
Zusammenstellung nach WERCKENTHIN und SCHWARZ (2003) und
nach CLSI (NCCLS 2004)

Stellvertretersubstanz im Antibiogramm	Wirkstoffgruppen
Ampicillin	Amoxicillin u. a. Aminopenicilline
Clindamycin	Lincosamide (z.B. Lincomycin)
Enrofloxacin	Fluorchinolone
Penicillin G	Penicilline (verschieden Salze)
Sulfisoxacol, Sulfamethoxacol	Sulfonamide
Tetracyclin	Tetracycline (auch Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Doxycyclin)
Tilmicosin	gilt auch für Tylosin und Spiramycin
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	Kombinationen aus Trimethoprim und Sulfonamiden

Dabei ist zu beachten, dass sich die Wirkung verschiedener Antibiotika einer Gruppe dennoch unterscheiden kann. So gibt es Hinweise dafür, dass die Wirkung verschiedener Tetracycline nicht immer gleich ist (POMMIER 2006). Und auch wenn Clindamycin stellvertretend für Lincomycin getestet wird, so sind auch hier Unterschiede in der Wirkung gegen Staphylokokken bekannt (NCCLS 2004). Tabelle 6 gibt einen Überblick über einige beim Geflügel verwendete Wirkstoffgruppen und möglicher Stellvertretersubstanzen.

2.4.6 In-vivo-Relevanz von Ergebnissen der Empfindlichkeitstests

Der klinische Behandlungserfolg bakterieller Erkrankungen spiegelt häufig nicht die Ergebnisse der *in-vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung des Krankheitserregers wieder. Als mögliche Ursachen hierfür kommt neben Behandlungsfehlern wie Unterdosierung oder Antagonismus durch falsche Antibiotikakombinationen auch ein Wechsel des Erregers oder die Testung eines Bakteriums, welches nicht für die Erkrankung ursächlich ist, in Frage. Ein unzureichender Wirkspiegel des Wirkstoffes am Infektionsort, eine Resistenzentwicklung oder Selektion resistenter Erregerpopulationen unter Therapie, ebenso wie Interaktionen mit anderen Arzneimitteln, beeinflussen *in vivo* den Therapieerfolg (SPENCKER 1999). TURNIDGE et al. (2007) sehen es als sicherer an, Testmethoden zu verwenden, welche eine intermediäre Kategorie haben, da eine fehlende Pufferzone zu höheren Zahlen falscher Einteilungen führen kann. Ansonsten müssten intermediäre Ergebnisse als resistent übermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft und Anzahl der bakteriellen Isolate

Die untersuchten bakteriellen Isolate stammten aus der Routinediagnostik des bakteriologischen Labors der Klinik für Vögel im Zeitraum von September 2006 bis April 2008. Es wurden ausschließlich solche Keime zu den Empfindlichkeitstests herangezogen, welche aus dem eingesandten Probenmaterial von Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*), Pute (*Meleagris gallopavo domestica*) oder Peking- und Moschusente (*Anas platyrhynchos domesticus* bzw. *Cairina moschata domestica*) isoliert wurden. Die Proben stammten aus insgesamt 113 verschiedenen Nutzgeflügelbetrieben und wurden meist über deren betreuende Tierärzte zur bakteriologischen Untersuchung eingesandt. Davon wurde für zehn Betriebe jeweils nur eine Empfindlichkeitsbestimmung an einem einzigen Bakterienisolat im Beobachtungszeitraum durchgeführt. Von dem Betrieb mit der größten Anzahl an Resistenztests wurden insgesamt 105 Isolate im selben Zeitraum auf die Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. Von den aus dem Probenmaterial erfassten Isolaten verschiedener Bakterien stammten 2227 von Mastküken und Broilern, 85 von Legehennenküken, 59 von Legehennen, 83 von Puten und acht aus Entenbeständen. Die insgesamt 2462 isolierten bakteriellen Keime wurden mittels Agardiffusionstest auf deren Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. Zudem wurde parallel von 556 Isolaten die MHK durch eine Bouillon-Mikrodilution bestimmt. Die Anzahl der getesteten Bakterienarten ist in Abbildung 12 und 13 aufgeführt. Dabei sind Keime, welche nur in untergeordneter Quantität vorkamen, zu den Gruppen „Andere Grampositive“ (*Bacillus* spp., *Streptococcus* spp.) und „Andere Gramnegative“ (*Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Bordetella* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia fergusonii*, *Pantoea* spp., *Pasteurella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Vibrio* spp.) zusammengefasst.

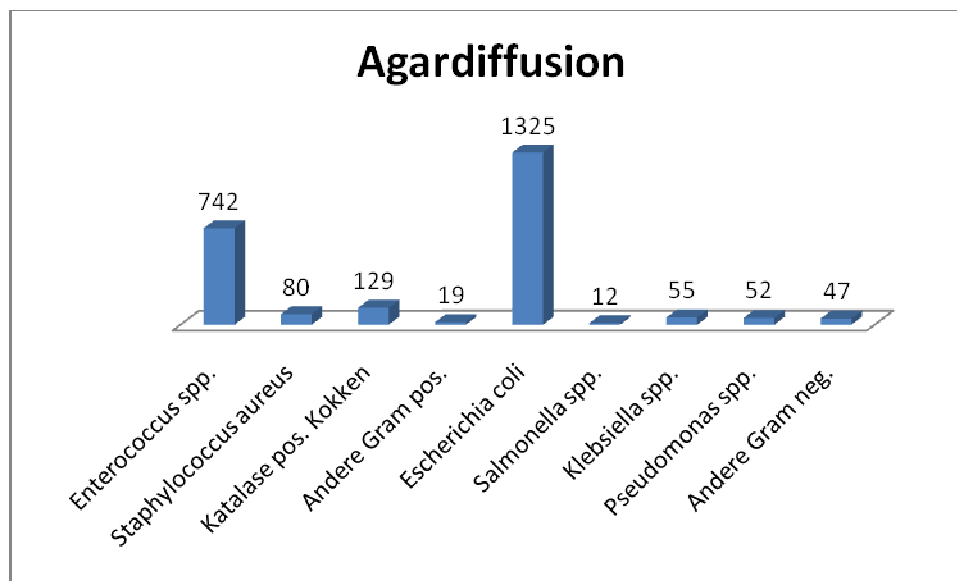


Abbildung 12: Bakterienisolate im Agardiffusionstest

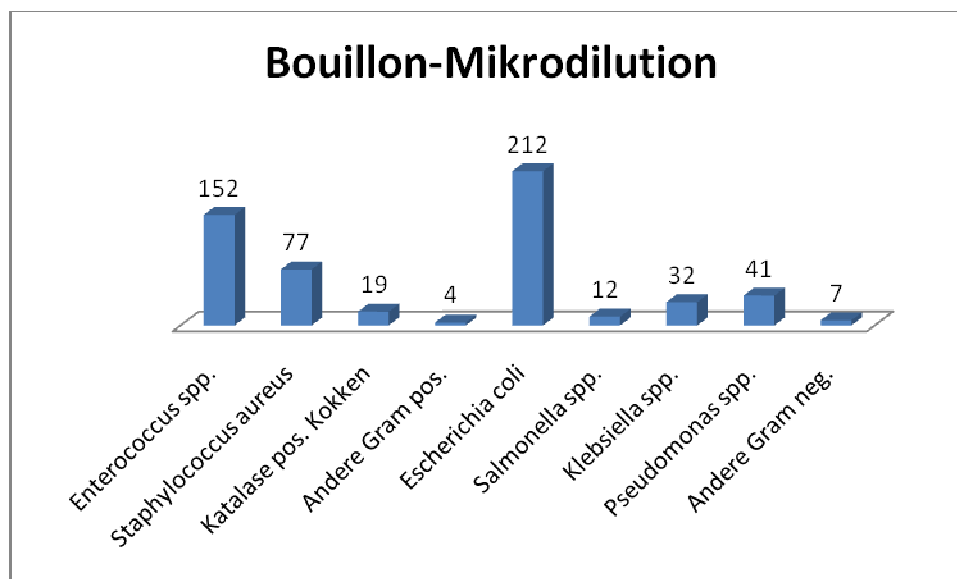


Abbildung 13: Bakterienisolate in der Bouillon-Mikrodilution

3.1.2 Kontrollstämme

Zur Kontrolle der Testdurchführung wurden Referenzstämme gemäß den CLSI Vorschriften M31-A2 und M31-S1 mitgeführt (NCCLS 2002, NCCLS 2004). Diese stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und sind identisch mit den entsprechenden Stämmen der American Type Culture Collection (ATCC). Als Kontrollstämme zum Agardiffusionstest wurden

Staph. aureus DSM 1104 (ATCC 25923) und *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922) verwendet.

Tabelle 7: Grenzwerte für HHD der Referenzstämme nach M31-S1 (NCCLS 2004) in mm

Wirkstoff	Plättchenkonzentration	<i>E. coli</i> (DSM 1103) ATCC 25922	<i>Staph. aureus</i> (DSM 1104) ATCC 25923
Ampicillin	10 µg	16 – 22	27 – 35
Clindamycin	2 µg	Kein Hemmhof	24 – 30
Enrofloxacin	5 µg	32 – 40	27 – 31
Erythromycin	15 µg	Kein Hemmhof	22 – 30
Penicillin	10 Einheiten	Kein Hemmhof	26 – 37
Tetracyclin	30 µg	18 – 25	24 – 30
SXT	1,25/23,75 µg	23 - 29	24 – 32

Tabelle 8: Grenzwerte für MHK der Referenzstämme nach M31-A2 und M31-S1 (NCCLS 2002, NCCLS 2004) in µg/ml

Wirkstoff	<i>E. coli</i> (DSM 1103) ATCC 25922	<i>Staph. aureus</i> (DSM 2569) ATCC 29213
Ampicillin	2 – 8	0,5 – 2
Clindamycin	---	0,06 – 0,25
Enrofloxacin	0,008 – 0,03	0,03 – 0,12
Erythromycin	---	0,25 – 1
Penicillin	---	0,25 – 2
Spectinomycin	8 – 64	64 – 256
Tetracyclin	0,5 – 4	0,12 – 1
Tiamulin	---	0,5 – 2
Tilmicosin	>= 64	1 – 4
Trimethoprim-Sulfonamid (1/19)	<= 0,5/9,5	<= 0,5/9,5

Als Referenzstämme für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode fanden *Staph. aureus* DSM 2569 (ATCC 29213) und *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25944) Verwendung. Die Grenzwerte der dazugehörigen HHD und MHK können aus Tabelle 7 und 8 entnommen werden. Für Colistin und Neomycin liefern die oben genannten Durchführungsvorschriften keine Informationen zum Verhalten der Kontrollstämme.

3.1.3 Nähragar- und Mikrotiterplatten

Für den Agardiffusionstest wurde Müller-Hinton Agar (MH, PO5007A, Oxoid GmbH, Wesel) in Form industriell gefertigter Platten mit einem Durchmesser von 90 mm verwendet. Zur Testung von Streptokokken kamen Müller-Hinton-Platten mit Zusatz von 5% defibriertem Schafsblut (MH-Blut, PB5007A, Oxoid), zur Anwendung (NCCLS 2002). Die Lagerung erfolgte bei 2 bis 8 °C. Die für die Bestimmung der MHK verwendete Mikrotiterplatte (MICRONAUT-S Großtiere, E1-792-100, MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel) war in Form einer 96-Loch-Platte mit insgesamt 19 Wirkstoffen zu je drei bis neun Konzentrationsstufen, sowie mit zwei Wachstumskontrollen belegt. Diese Platte, eigentlich für die Empfindlichkeitstestung von Mastitiserregern und Bakterien bei Infektionen von Großtieren konzipiert (LUHOFER et al. 2004), war mit allen zur Testung vorgesehenen Antibiotika bestückt. Die Antibiotika lagen dabei in denjenigen Konzentrationsstufen vor, welche mindestens nötig waren um anhand von „breakpoints“ eine qualitative Zuordnung in resistent, sensibel und intermediär treffen zu können. Das entsprechende Plattenlayout ist in Abbildung 14 dargestellt. Diese Platte wurde als industriell vollständig vorgefertigte Einheit ohne weitere Modifikation angewandt. Die Lagerung der einzeln verpackten und eingeschweißten Platten erfolgte bei Zimmertemperatur (ca. 18 – 20°C). Neben den von uns geforderten Wirkstoffen war die Mikrotiterplatte für die Anwendung bei Erregern von Großtieren noch mit weiteren Antibiotika bestückt, welchen im Rahmen dieser Untersuchungen keine weitere Bedeutung zukam. Diese sind in Abbildung 14 schräg durchgestrichen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	GC	Amo/ Cla 2/1	Amo/ Cla 4/2	Amo/ Cla 8/4	Amo/ Cla 16/8	Amo/ Cla 32/16	Spe 8	Spe 16	Spe 32	Spe 64	Spe 128
B	Amp 0,125	Amp 0,25	Amp 0,5	Amp 1	Amp 2	Amp 4	Amp 8	Amp 16	Amp 32	Apr 8	Apr 16	Apr 32
C	Pen 0,0625	Pen 0,125	Pen 0,25	Pen 0,5	Pen 1	Pen 2	Pen 4	Pen 8	Pen 16	Neo 8	Neo 16	Neo 32
D	Cel 2	Cel 4	Cel 8	Cel 32	Ceq 1	Ceq 2	Ceq 3	Ceq 8	Cet 1	Cet 2	Cet 4	Cet 8
E	Ery 0,125	Ery 0,25	Ery 0,5	Ery 1	Ery 2	Ery 4	Ery 8	Cli 0,25	Cli 0,5	Cli 1	Cli 2	Cli 4
F	Til 4	Til 8	Til 16	Til 32	Flo 1	Flo 2	Flo 4	Flo 8	Gen 2	Gen 4	Gen 8	Gen 16
G	Tet 1	Tet 2	Tet 4	Tet 8	Tet 16	SXT 0,25/4,75	SXT 0,5/9,5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	Tia 4	Tia 8
H	Enr 0,0625	Enr 0,125	Enr 0,25	Enr 0,5	Enr 1	Enr 2	Col 0,5	Col 1	Col 2	Col 4	Tia 16	Tia 32

Angabe der Konzentrationen in µg/ml

Ampicillin	Amp
Amoxicillin/Clavulansäure	Amo/Cla
Apramycin	Apr
Cefquinom	Ceq
Ceftiofur	Cet
Cephalothin	Cel
Clindamycin	Cli
Colistin	Col
Enrofloxacin	Enr
Erythromycin	Ery
Florfenicol	Flo
Gentamycin	Gen
Neomycin	Neo
Penicillin	Pen
Spectinomycin	Spe
Tetracyclin	Tet
Tiamulin	Tia
Tilmicosin	Til
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	SXT
Growth Control	GC

Abbildung 14: Layout zur Antibiotikabelegung der Mikrotiterplatte mit Legende.

3.1.4 Antibiotische Wirkstoffe

Die Verwendung der Wirkstoffe zur Agardiffusion erfolgte in Form industriell gefertigter Antibiotika - Testplättchen, welche mit der entsprechenden Menge des jeweiligen antibiotischen Stoffes versehen waren. Im Agardiffusionstest wurden Isolate gramnegativer Bakterien auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin (AMP10µg CT0003B, Oxoid GmbH, Wesel), Colistin (CT, CT0017B, Oxoid), Enrofloxacin (Baytril® ENR5µg, Bayer AG, Leverkusen), Neomycin (N30µg, CT0033B, Oxoid), Tetrazyklin (TE30µg, CT0054B, Oxoid), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT25µg, CT0052B, Oxoid), und gelegentlich Spectinomycin (SH100µg, CT0823B, Oxoid) getestet. Alle grampositiven Bakterien wurden auf ihr Resistenzverhalten bezüglich Ampicillin, Enrofloxacin, Erythromycin (E15µg, CT0020E, Oxoid), Lincomycin (MY15µg, CT0028B, Oxoid), Neomycin, Tetracyclin, SXT, sowie z.T. auch Penicillin (P10IU, CT0043B, Oxoid) untersucht. Diese wurden bei – 20 °C gelagert. Die Empfindlichkeitstestung gegenüber Penicillin und Spectinomycin mittels Agardiffusionstest wurde in der Routinediagnostik nur vereinzelt und unregelmäßig, in der Regel nach Anforderung der einsendenden TierärztInnen vorgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei grampositiven Keimen die MHK der Wirkstoffe Ampicillin, Clindamycin, Enrofloxacin, Erythromycin, Neomycin, Penicillin, Tetrazyklin, Tiamulin, Tilmicosin, sowie Spectinomycin und SXT ausgewertet. Bei gramnegativen Keimen wurde die MHK von Ampicillin, Colistin, Enrofloxacin, Neomycin, Spectinomycin, Tetrazyklin, sowie Tiamulin und SXT untersucht. Die Auswahl der zu testenden Antibiotika erfolgte in Hinblick auf die aktuell für die Verwendung am Wirtschaftsgeflügel auf dem deutschen Markt zugelassenen Arzneimittel und deren Wirkstoffe (QS 2008, VETIDATA 2008).

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht und Differenzierung der Bakterien

Die Anzucht und Differenzierung der getesteten Bakterienisolate erfolgte durch das bakteriologische Labor der Klinik für Vögel. Bei dem Ausgangsmaterial hierfür handelte es sich um Organtupfer von Leber, Dottersack, Herz, Gelenken, Lunge oder

Luftsack, sowie von Darm, Kot oder einzelnen anderen Organen. Das eingesandte Probenmaterial wurde mit sterilen Tupfern auf drei verschiedene industriell gefertigte Nährböden aufgebracht und mit einem Drei - Ösen - Ausstrich verdünnt. Standardmäßig wurden für die Anzucht Columbia Agar mit Schafblut (COL, PB5039, Oxoid GmbH, Wesel), ein Selektivnährboden für grampositive Kokken mit Colistin und Nalidixinsäure (Columbia CNA, PB5049A, Oxoid), sowie ein Eoisin-Methylenblau Agar (EMB, PO5045A, Oxoid) zur Isolierung von Enterobacteriaceae in Form industriell vorgefertigter Platten verwendet. Die beimpften Nährböden wurden dann 18 – 24 Stunden im Brutschrank bei 36 °C bebrütet. Falls nach 24 Stunden Bebrütungsdauer kein bakterielles Wachstum zu erkennen war, wurde die Inkubation bei 36 °C für weitere 18 – 24 Stunden vorgenommen. Anschließend wurde eine Vereinzelung der gewachsenen Keime mit sterilen Ösen durchgeführt und reine Subkulturen wurden angezüchtet. Die Anreicherung von Salmonellen erfolgte auf Grundlage von DIN EN ISO 6579 (DIN 2003, DIN 2007) mittels Voranreicherung des Probenmaterials in 10-ml-Röhrchen gepufferten Peptonwassers (Difco™ 218105, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) bei 36 °C für 18 bis 20 Stunden. Im Anschluss daran erfolgte nach Überführung von 100 µl der Peptonwassersuspension in Röhrchen mit 10 ml flüssigem Rappaport-Vasiliadis Anreicherungsmedium (RV, CM0699, Oxoid) eine Selektivanreicherung bei 41 °C für ca. 24 Stunden. Aus der Selektivanreicherung wurden dann jeweils ein Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar und ein Salmonella-Chromogen-Selektivnährboden (XLD/OSCM, PO5248E, Oxoid) mittels Dreiösenausstrich beimpft, bei 36 °C ebenfalls 24 Stunden bebrütet und auf Salmonellen verdächtige Kolonien (schwarz auf XLD, rosa bis lila auf OSCM) hin untersucht. Eine erste Einteilung aller isolierten Bakterien erfolgte anhand der gewachsenen Bakterienkulturen, deren Farbe und auch nach deren Hämolyse, Form und Geruch. Zudem wurde eine Gram-Färbung der Bakterien durchgeführt. Grampositive Kokken wurden, mit 3 %iger H₂O₂-Lösung versetzt, auf die Bildung von Katalase hin untersucht. Eine positive Katalasereaktion wurde durch Gasbildung angezeigt. Katalasepositive Kokken wurden auf das Vorhandensein des Enzyms Hyaluronidase getestet. Bei gegebener Hyaluronidase-produktion wurde nach 24-stündiger aerober Bebrütung bei 36 °C das schleimige Wachstum von *Streptococcus equi equi* durch die zu testenden Stämme am Kontaktpunkt unterdrückt (sog. Dekapsulationstest oder DT). Alle DT-positiven Isolate wurden auf *Staph. aureus* hin untersucht. Die Identifizierung von *Staph. aureus* erfolgte mit Hilfe eines Latex-

Agglutinationstests (Staphtect Plus, DR0850M, Oxoid) über die Detektion von Clumping-Faktor, Protein A und der Kapselantigene von MRSA. Zur selektiven Isolierung von Enterokokken fand ein Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährboden (KAA, PO5059A, Oxoid) Anwendung, auf welchem *Enterococcus spp.* nach 18 bis 24-stündiger Bebrütung bei 41 °C meist als gleichmäßig runde, graue Kolonien wachsen und zu einer Schwarzfärbung (Äsculin - positiv) des gelben Agars führen. Zur weiteren Differenzierung und Identifizierung der Keime kamen biochemische Differenzierungssysteme zum Einsatz. Der BBL™-Crystal™-Gram-Positive-ID-Testkit (245140, Becton Dickinson) und das api®20 Strep-System (20600, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) wurden zur Bestimmung grampositiver Bakterienstämme verwendet. Bei gramnegativen Stäbchen wurde die Cytochrom-c-Oxidase-Tätigkeit mittels vorgefertigter Testplättchen (BBL™-DrySlide™-Oxidase, 231746, Becton Dickinson) überprüft. Anschließend wurden oxidasenegative Isolate mit dem api®20 E- und oxidasepositive mit dem api®20 NE - System (20100 bzw. 20050, bioMérieux) differenziert. Dabei wurde nicht in jedem Fall eine vollständige Identifizierung vorgenommen. Beim Auftreten von katalase-, grampositiven Kokken wurde nach Ausschluss von *Staph. aureus* meist keine weitere Speziesbestimmung durchgeführt. *E. coli* ließ sich meist allein durch sein typisches Koloniewachstum auf der Eosin-Methylenblau Agarplatte mit ausgeprägtem, grünlich-metallisch-schimmernden Glanz (Oxoid 2007) und aufgrund seines typischen Geruchs identifizieren, sodass auch hier auf weitere Untersuchungen in der Regel verzichtet werden konnte.

3.2.2 Agardiffusionstest

Die Empfindlichkeitstestung schnell wachsender Bakterien mittels Agardiffusionstest erfolgte auf der Grundlage der NCCLS - Vorgaben M31-A2 (NCCLS 2002). Die angewandte Inokulumsherstellung basierte auf einer direkten Suspension bakterieller Kolonien. Hierzu wurden von einer 18 bis 24 Stunden alten Bakterienreinkultur auf Blutagarplatten genügend Kolonien entnommen, um diese in 5 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung direkt zur Suspension zu bringen. Nach vollständiger, gleichmäßiger Durchmischung der Bakteriensuspension wurde visuell, mit Hilfe geeichter, industriell gefertigter Standardröhrchen (McFarland Standard, 70900, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen), das Inokulum auf den Trübungsstandard McFarland 0,5 eingestellt.

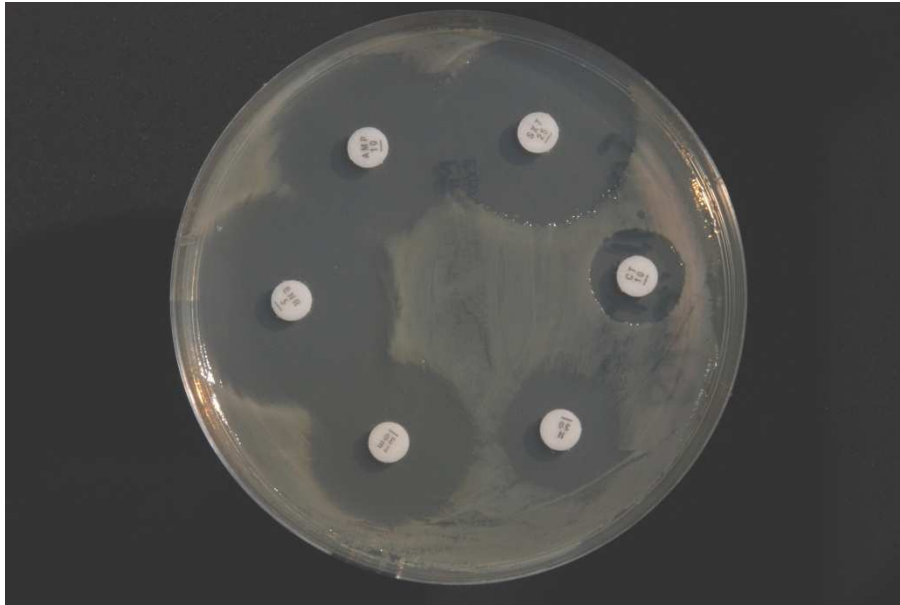


Abbildung 15: Agardiffusionstest mit *Salmonella sp.* auf Mueller-Hinton Agar mit Hemmhöfen

Nach spätestens 15 Minuten, und wiederholter Mischung des Inokulums, wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf eine Mueller-Hinton-Agar-Platte oder bei Streptokokken auf MH-Platten mit 5 % defibriniertem Schafblut, pipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig über die gesamte Platte verstrichen. Dies geschah in Abwandlung zum CLSI - Protokolls (NCCLS 2002), das hierzu die Verwendung eines Stäbchentupfers vorsieht. Nach kurzer Antrocknung des Inokulums wurden nach etwa 5 min, spätestens aber nach 15 min, gleichzeitig bis zu acht verschiedene industriell gefertigte, antibiotikabestückte Testplättchen unter sanften Druck auf die Mueller-Hinton-Agarplatte aufgebracht, was unter Zuhilfenahme eines entsprechenden Handandruckdispensers (ST6090 o. ST8090, Oxoid GmbH, Wesel) geschah, um einen gleichmäßigen Abstand der Plättchen zu gewährleisten. Anschließend wurden die bestückten Platten innerhalb von 15 min in einen, auf 36°C aufgeheizten Brutschrank gebracht.

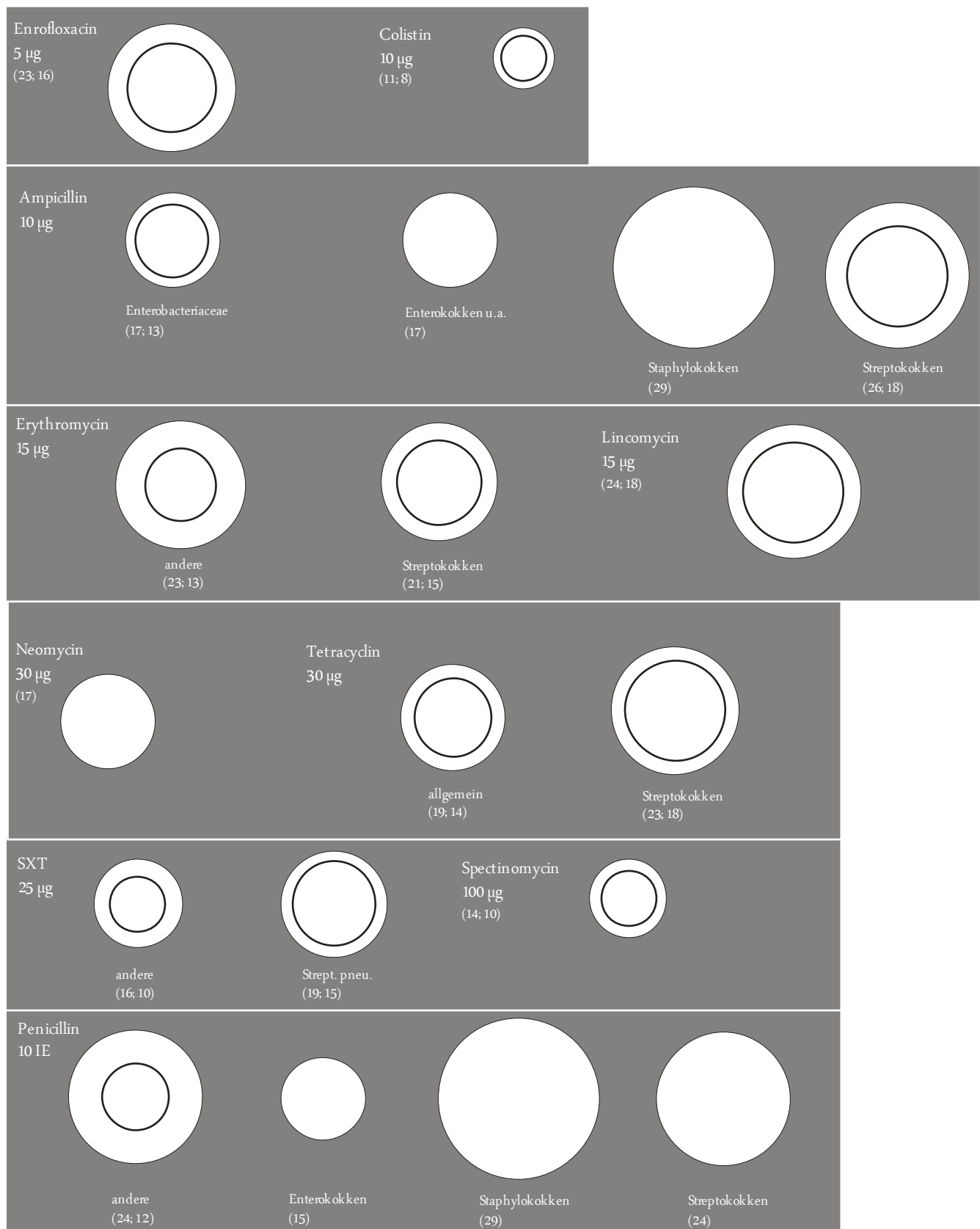


Abbildung 16: Schablonenvorlage zum Ablesen und Einteilen der HHD beim Agardiffusionstest

Nach 16 bis 18 Stunden Inkubationszeit - Streptokokken wurden 20 bis 24 Stunden unter 5 %iger CO₂ - Atmosphäre bebrütet - wurden die Durchmesser der eventuell um die Antibiotikatestblättchen entstandenen Hemmhöfe ermittelt und die qualitative Einteilung der getesteten Keime in sensibel, intermediär und resistent vorgenommen. Voraussetzung war, dass nach der Inkubation ein konfluierender oder fast konfluierender Bakterienrasen vorlag. Anderenfalls war die Bakteriendichte zu gering und der Test wurde wiederholt. Bei Verunreinigung des Agars durch das Wachstum anderer Bakterien als den zu testenden Stamm wurde der Test ebenfalls wiederholt. Als Hemmhof wird der Bereich bezeichnet, in welchem aufgrund der Wirkung antibiotischer Stoffe kein Bakterienwachstum stattfindet (Abbildung 15). Bei Wachstum einzelner Kolonien in einem ansonsten deutlich ausgeprägten klaren Hemmhof wurden diese Kolonien differenziert und der Test bei Verunreinigung ggf. wiederholt. Zum leichteren Ablesen der Hemmhöfe und der qualitativen Einteilung wurde eine eigens angefertigte Schablone verwendet (Abbildung 16).

3.2.3 Hemmhofdurchmesser

Für die Wirkstoffe Enrofloxacin, Ampicillin, Erythromycin, Tetracyclin, Spectinomycin, Penicillin, sowie für SXT lagen CLSI-Vorgaben für die HHD vor (NCCLS 2002, NCCLS 2004). Grenzwerte zur Einteilung der HHD waren für Colistin, Lincomycin und Neomycin in den CLSI- Schriften nicht aufgeführt, sodass hierfür HHD-Werte aus anderen Regelwerken für die qualitative Einordnung zugrunde gelegt wurden. Dabei handelte es sich für Colistin, Neomycin und Lincomycin um Vorschläge der DVG (AVID 1997, AVID 1999). Für die Auswertung von Neomycin wurde entgegen der Vorgaben kein intermediärer Bereich festgelegt. Nicht weiter spezifizierte katalasepositive Kokken wurden nach den Grenzwerten für *Staphylococcus spp.* beurteilt.

3.2.4 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Die Testdurchführung erfolgte nach der Vorgangsbeschreibung im Prüfprotokoll der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der DVG (DVG 2004), basierend auf den Vorgaben von CLSI M31-A2 (NCCLS 2002) bzw. dort, wo angegeben, nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mikrotiterplatten. Von einer 18 bis 24 Stunden alten Reinkultur auf Blutagar wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Öse entnommen und in 5 ml einer 0,9%iger Natriumchlorid – Lösung zur Suspension

gebracht. Die Trübung der Suspension wurde visuell mit bloßem Auge anhand eines industriell gefertigten Trübungsstandards auf McFarland 0,5 eingestellt. 50 µl der Suspension wurden anschließend in 11 ml Mueller-Hinton-II-Bouillon (BBL™ 212322, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gegeben (MERLIN 2004), welcher zur Testung von Streptokokken noch 2 bis 5 % lysiertes Pferdeblut zugegeben wurde, und mit einem Vortex-Mischer suspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 µl in 10 ml 0,9 %iger Natriumchlorid - Lösung überführt und gut durchmischt. Davon wurden wiederum 100 µl zur Dichtekontrolle auf eine Blutplatte pipetiert und mit einem Drigalskispatel ausgespatelt wurden. Des Weiteren wurde von der Bouillon eine Öse voll entnommen und davon ein Drei-Ösen-Ausstrich zur Reinheitskontrolle auf einer Blutplatte angefertigt. Je 100 µl der Bouillon wurden dann mit einer Acht-Kanal-Pipette in jede Kavität der industriell gefertigten Mikrotiterplatte pipettiert. Dies entsprach den Herstellerangaben zur Beimpfung der Platte (MERLIN 2004).

Tabelle 9: HDD – Grenzwerte in mm zur qualitativen Einteilung

Antibiotika		sensibel	intermediär	resistent	Quelle
Enr 5 µg	<i>Pasteurella multocida</i>	≥ 23	17 – 22	≤ 16	NCCLS 2004 (Huhn/Pute)
	<i>E. coli</i>				
	andere	≥ 23	17 – 22	≤ 16	NCCLS 2004
Col 10 µg	allgemein	≥ 11	9 – 10	≤ 8	AVID 1997
Amp 10 µg	Enterobacteriaceae	≥ 17	14 – 16	≤ 13	NCCLS 2004
	Staphylokokken	≥ 29	-	≤ 28	
	Streptokokken	≥ 26	-	≤ 25	
	Enterokokken	≥ 17	-	≤ 16	
Ery 15 µg	Streptokokken	≥ 21	16 - 20	≤ 15	NCCLS 2004
	andere	≥ 23	14 - 22	≤ 13	
Lin 15 µg	allgemein	≥ 24	19 - 23	≤ 18	AVID 1999
Neo 30 µg	oral	≥ 17	-	≤ 16	AVID 1999
Tet 30 µg	Streptokokken	≥ 23	19 - 22	≤ 18	NCCLS 2004
	andere	≥ 19	15 - 18	≤ 14	NCCLS 2004
SXT 1,25/23,75 µg	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≥ 19	16 - 19	≤ 15	NCCLS 2004
	andere	≥ 16	11 - 15	≤ 10	
Spe 100 µg	allgemein	≥ 14	11 - 13	≤ 10	NCCLS 2004
Pen 10 IE	Staphylokokken	≥ 29	-	≤ 28	NCCLS 2004
	<i>Streptococcus sp.</i>	≥ 24	-	≤ 23	
	Enterokokken	≥ 15	-	≤ 14	
	andere	≥ 24	13 - 23	≤ 12	DIN 2000a

Die Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung und die mit MH-Bouillon wurden bereits eine halbe Stunde vor Gebrauch zum Vorwärmen in den 36  C - Brutschrank gestellt. Die Mikrotiterplatten wurden bei Zimmertemperatur gelagert und frühestens 30 Minuten vor Verwendung aus der Verpackung entnommen. Die beimpfte Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie oder einer weiteren Mikrotitrationsplatte (max. 5 Testplatten übereinander) abgedeckt und zusammen mit den Kontrollplatten für 18 bis 24 Stunden bei 36  C bebrütet. Der Test wurde als korrekt angenommen sofern beide Wachstumskontrollen auf der Mikrotiterplatte positiv waren, die Reinheitskontrolle ohne Kontamination war und die Dichtekontrolle den Erfordernissen entsprach. Nach NCCLS wird von einer Inokulumsdichte von 5×10^5 Bakterien/ml ausgegangen, was einem Wachstum von 50 Einzelkolonien auf der Kontrollplatte entspricht. In Anlehnung an die Erfordernisse im Rahmen eines DVG-Ringversuchs (DVG 2004) wurde eine Konzentration von 2×10^5 bis 8×10^5 Bakterien/ml im Inokulum als ausreichend angenommen, was einem Wachstum von 20 bis 80 Einzelkolonien auf der Agarplatte bei der Dichtekontrolle entspricht (Abbildung 18). Wenn die Konzentration weiter ab, so wurde der Test als ungültig gewertet und wiederholt. Aufgrund des Wachstums der Bakterien in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden für den getesteten Keim die MHK der Antibiotika visuell ermittelt.

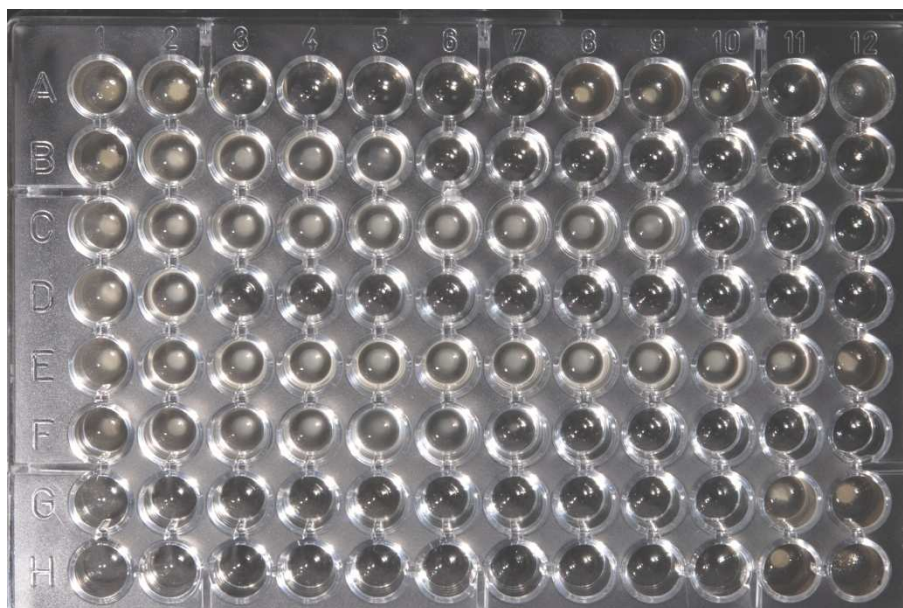


Abbildung 17: Mikrotiterplatte nach 18 Stunden Inkubation mit *E. coli*

Dabei ist die geringste Konzentration eines Wirkstoffes, bei welcher die Bakterien gerade nicht mehr wachsen, gleichbedeutend mit der MHK. Das bedeutet, dass z.B. für einen Bakterienstamm, welcher auf der Mikrotiterplatte bei einer Enrofloxacin-Konzentration von 0,5 µg/ml noch wuchs, jedoch bei 1 µg/ml kein Wachstum mehr zeigte, die MHK von 1 µg/ml festgestellt wurde.



Abbildung 18: Platte zur Dichtekontrolle eines Inokulums mit *Staph. aureus* für die Bouillon-Mikrodilution

3.2.5 Minimale Hemmkonzentration und Grenzwerte (break points)

Anhand von Grenzwerten, sog. break points, wurde der quantitative Wert der MHK in eine qualitative Einteilung nach sensibel, intermediär und resistent überführt. Für die Wirkstoffe Enrofloxacin, Ampicillin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracyclin, Tilmicosin, Penicillin, Spectinomycin, sowie der Kombination aus Trimethoprim und Sulfonamid (SXT) waren NCCLS-Vorgaben verfügbar (NCCLS 2002; NCCLS 2004). Für Colistin, Clindamycin und Neomycin lagen keine break points nach NCCLS vor, sodass hier entsprechende Werte aufgrund von Vorschlägen aus anderen Normen oder Arbeitsgruppen (AVID 1999, DIN 2000b) herangezogen wurden (Tabelle 10). Nicht weiter spezifizierte katalasepositive Kokken wurden nach den Grenzwerten für *Staphylococcus* spp. beurteilt.

Tabelle 10: Grenzwerte (break points) für MHK – Werte (in µg/ml)

AB		sensibel	intermediär	resistent	Quelle 20004
Enr	<i>Pasteurella multocida</i>	≤ 0,25	0,5 – 1	≥ 2	NCCLS 2004 (Huhn/Pute)
	<i>E. coli</i>				
	andere	≤ 0,5	1 – 2	≥ 4	
Col	allgemein	≤ 0,5	1 - 2	≥ 4	DIN 2000b
Amp	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 8	16	≥ 32	NCCLS 2004
	Staphylokokken	≤ 0,25	-	≥ 0,5	
	<i>Streptococcus</i> (ausser <i>pneumoniae</i>)	≤ 0,25	0,5 - 4	≥ 8	
	Enterokokken	≤ 8	-	≥ 16	
	andere	≤ 2	4 - 8	≥ 16	
Ery	Streptokokken	≤ 0,25	0,5	≥ 1	NCCLS 2004
	andere	≤ 0,5	1 - 4	≥ 8	
Cli	<i>Clostridium perfringens</i>	≤ 2	4	≥ 8	NCCLS 2004 (Huhn)
	andere	≤ 1	2 - 4	≥ 8	DIN 2000b
Neo	oral	≤ 8	16	≥ 32	AVID 1999
Tet	Streptokokken	≤ 2	4	≥ 8	NCCLS 2004
	andere	≤ 4	8	≥ 16	
SXT	Streptokokken	≤ 0,5/9,5	1/19 – 2/38	≥ 4/76	NCCLS 2004
	andere	≤ 0,5/9,5	-	≥ 4/76	
Spe		≤ 32	64	≥ 128	NCCLS 2004
Til		≤ 8	16	≥ 32	NCCLS 2004
Tia		≤ 16	-	≥ 32	NCCLS 2004
Pen	Staphylokokken	≤ 0,12	-	≥ 0,25	NCCLS 2004
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,06	0,12 - 1	≥ 2	
	<i>Streptococcus sp.</i>	≤ 0,12	0,25 - 2	≥ 4	
	Enterokokken	≤ 8	-	≥ 16	
	andere	≤ 0,12	0,25 - 1	≥ 2	

3.2.6 Kontrollstammführung

Um die korrekte Durchführung der Empfindlichkeitstests zu gewährleisten und ggf. methodische oder Material bedingte Fehler erkennen zu können, wurden regelmäßig parallel zu den eigentlichen Untersuchungen Referenzstämme (siehe hierzu 3.1.2) zur Kontrolle getestet und deren Ergebnisse mit den entsprechenden Vorgaben verglichen (NCCLS 2004). Dies galt sowohl für die Durchführung der Agardiffusions-tests als auch für die MHK-Bestimmung mittels Bouillon-Mikrodilution. Bei Abweichungen von den Vorgaben wurden die Tests wiederholt, bis die Ergebnisse wieder im Sollbereich lagen und die Ursache der Abweichung abgestellt werden konnte. Anders als in den Vorgaben des CLSI zur Anwendung von

Referenzstämmen festgelegt (NCCLS 2002), wurden diese in Abhängigkeit vom Probenaufkommen mitgeführt. Das Ablesen der HHD der Kontrollstämmen wurde im Gegensatz zur Routinediagnostik nicht mit Schablonen vorgenommen, sondern durch millimetergenaues Messen mittels Schiebleere durchgeführt (Abbildung 19).

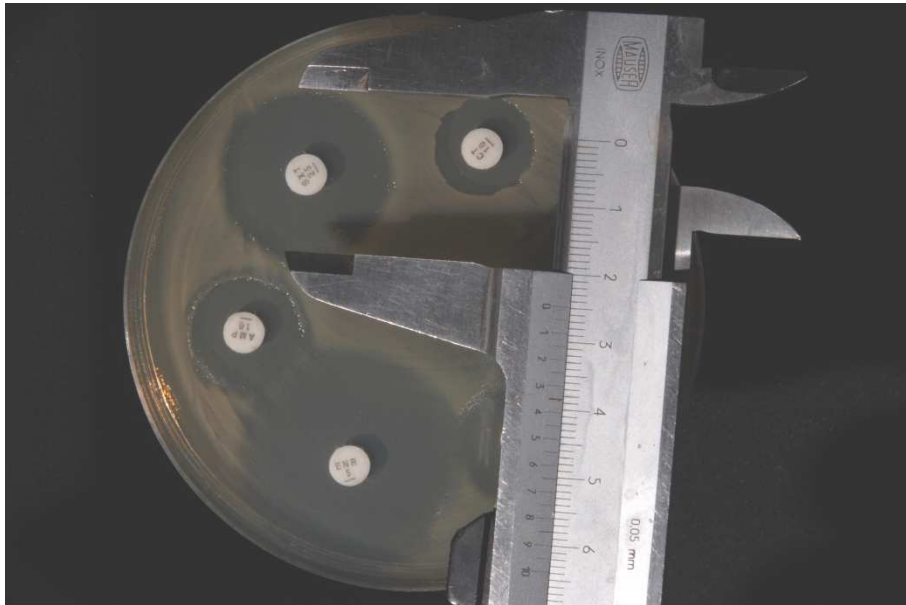


Abbildung 19: Kontrolle der HHD des *E. coli* – Referenzstammes DSM 1103 mit einer Schiebleere

3.3 Datenauswertung

Die in der Studie erhobenen Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 erfasst und geordnet. Die weitere statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS 16.0 für Windows.

Die qualitativen Ergebnisse des Agardiffusionstests und der Bouillon-Mikrodilution wurden in Form von Kreuztabellen gegenübergestellt und verglichen.

Um ein Maß für die Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode in Abhängigkeit von den getesteten Antibiotika zu erhalten, wurden hier die Korrelation nach Spearman (Spearman's Rho) und Cohen's Kappa ermittelt. Für Tabellen, in denen sowohl Zeilen als auch Spalten geordnete Werte enthalten, ergeben die Korrelationen den Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist ein Zusammenhangsmaß zwischen den Rangordnungen. Der Cohen-Kappa-Koeffizient misst die Übereinstimmung zwischen den Beurteilungen zweier

Prüfer, wenn beide dasselbe Objekt bewerten. Der Wert 1 bedeutet perfekte Übereinstimmung. Der Wert 0 bedeutet, dass die Übereinstimmung nicht über das zufallsbedingte Maß hinausgeht. Kappa ist nur für Tabellen verfügbar, in denen beide Variablen die gleiche Anzahl von Kategorien und gleiche Kategorienwerte - Ausprägungen - aufweisen (Definitionen laut Hilfethemen von SPSS 16.0 für Windows).

Zur Veranschaulichung der Verteilung der erfassten MHK - Werte wurden die dazugehörigen MHK_{50} und MHK_{90} ermittelt, die ein Maß für die Empfindlichkeit der getesteten Bakteriengruppen darstellen.

4 Ergebnisse

4.1 Agardiffusionstest

Tabelle 11: Keimspektrum im Agardiffusionstest

Anzahl	Bakterien	Anzahl	Bakterien	Anzahl	Bakterien
5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	<i>Serratia marcescens</i>
1	<i>Aeromonas sobria</i>	42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<i>Serratia sp.</i>
5	<i>Bacillus cereus</i>	2	<i>Klebsiella spp.</i>	3	<i>Shigella spp.</i>
2	<i>Bacillus spp.</i>	3	<i>Pantoea spp.</i>	80	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	<i>Bordetella avium</i>	1	<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
1	<i>Citrobacter freundii</i>	1	<i>Pasteurella sp.</i>	1	<i>Streptococcus sanguinis</i>
2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	<i>Streptococcus spp.</i>
18	<i>Enterobacter cloacae</i>	15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	<i>Vibrio sp.</i>
1	<i>Enterobacter spp.</i>	1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>		
742	<i>Enterococcus spp.</i>	4	<i>Pseudomonas putida</i>		
1325	<i>Escherichia coli</i>	2	<i>Pseudomonas spp.</i>		
2	<i>Escherichia fergusonii</i>	1	<i>Raoultella ornitholytica</i>		
129	katalase- u. grampositive	12	<i>Salmonella spp.</i>		
3	<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	<i>Serratia liquefaciens</i>		

Insgesamt wurden 2462 bakterielle Isolate auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. Davon waren 970 Isolate grampositive und 1492 Isolate gramnegative Bakterien. Es wurden zehn verschiedene antibiotische Wirkstoffe getestet. *Enterococcus spp.* und *E. coli* waren mit 742 bzw. 1325 Isolaten am häufigsten vertreten. Das entspricht 30,1% bzw. 53,8% der getesteten Keime. Von *Salmonella*

spp. wurden nur 12 Isolate untersucht. Eine Auflistung aller getesteten Bakterienisolate zeigt Tabelle 11. Die hier genannten Bakterienspezies wurden letztlich zu den Übergruppierungen *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staph. aureus*, *katalasepositive Kokken* und „Andere“ zusammengefasst. Bei den hier als katalasepositive Kokken bezeichneten Keimen handelt es sich um grampositive Kokken, welche auch eine positive Katalasereaktion zeigten (z.B. Staphylokokken, Mikrokokken u.a.), jedoch nicht weiter bezüglich der Spezies differenziert wurden. Die *Staph. aureus* - Stämme sind jedoch aufgrund ihrer besonderen Bedeutung separat aufgelistet.

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mit Hilfe des Agardiffusionstest sind im Anhang in den Tabellen 15 und 16 zusammengefasst. Der größte Anteil grampositiver Bakterien zeigte sich sensibel gegenüber Ampicillin (92,9 %) gefolgt von Penicillin (87,6 %). Bei *Staph. aureus* zeigten Erythromycin, Lincomycin, Neomycin, Penicillin und SXT eine noch bessere Wirkung. Im gramnegativen Keimspektrum zeigten die meisten Bakterien eine Empfindlichkeit gegenüber Colistin (98,5%) gefolgt von Neomycin (79,4%) und Enrofloxacin (77,3%). Zu beachten ist der nicht getestete und daher fehlende intermediäre Bereich bei Neomycin. Von den grampositiven Bakterien wurden nur 324 Isolate (33,4%) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Penicillin hin untersucht. Die Empfindlichkeitstestung gramnegativer Bakterien gegenüber Spectinomycin wurde bei 148 Stämmen (9,9%) durchgeführt.

Die Abbildungen 20 bis 25 stellen als Diagramme die Resistenzsituation wichtiger Bakteriengruppen dar. Dabei entspricht n der Gesamtzahl der untersuchten Bakterienstämme der einzelnen Gruppen.

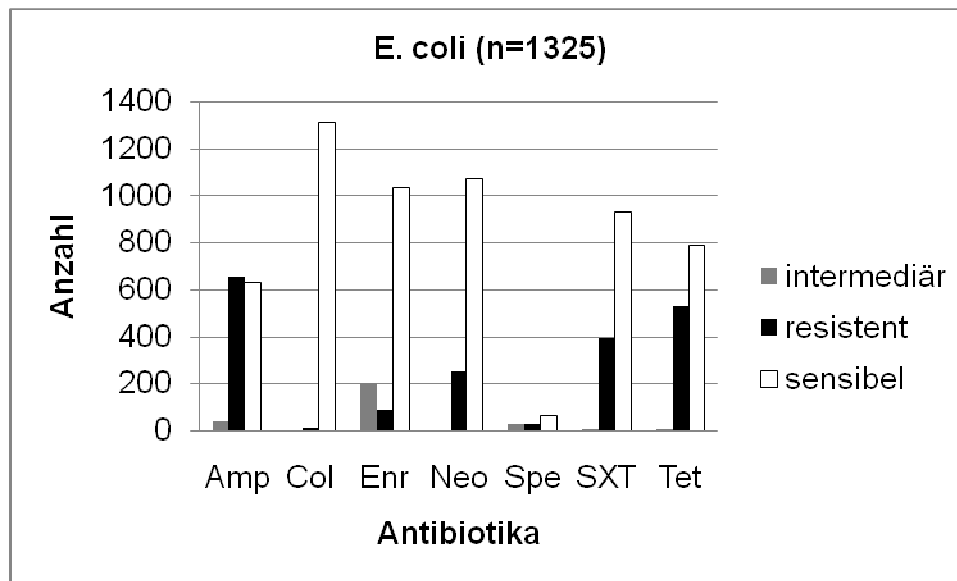


Abbildung 20: Ergebnisse der Agardiffusion, *E. coli*

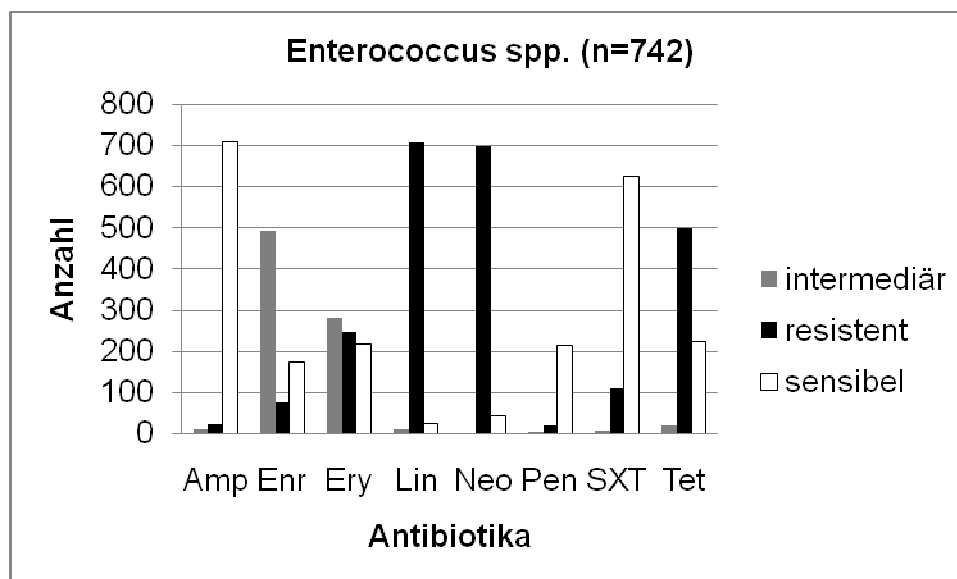


Abbildung 21: Ergebnisse der Agardiffusion, *Enterococcus* spp.

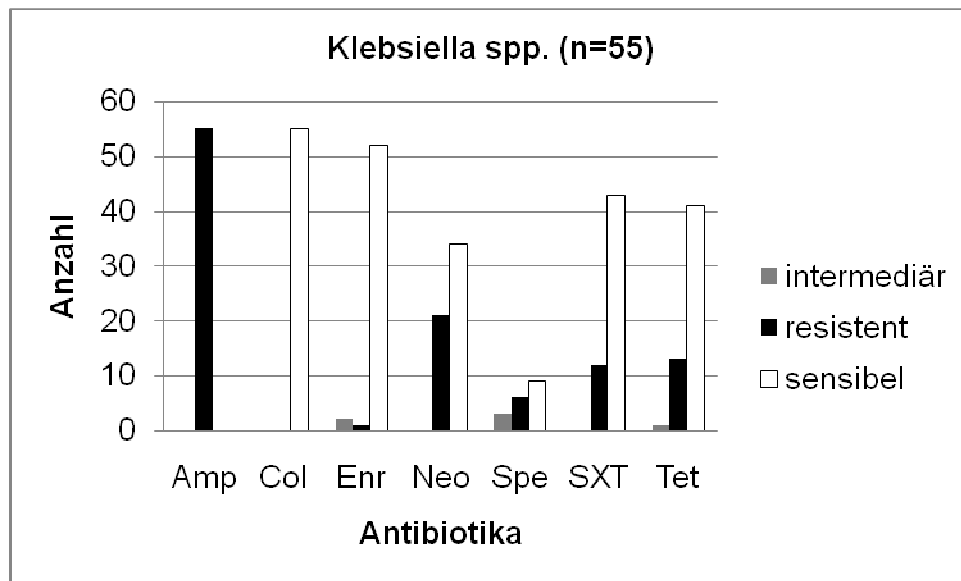


Abbildung 22: Ergebnisse der Agardiffusion, *Klebsiella* spp.

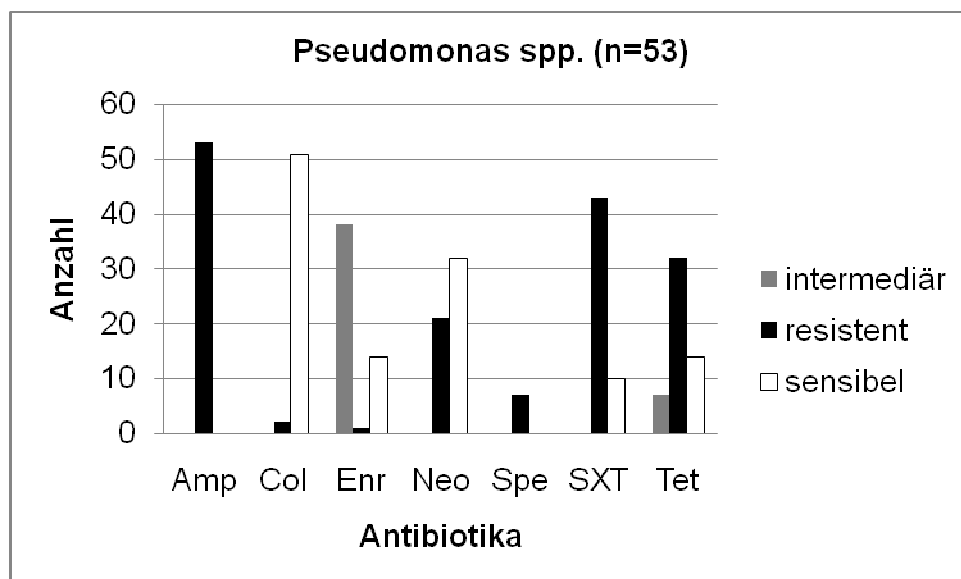


Abbildung 23: Ergebnisse Agardiffusion, *Pseudomonas* spp.

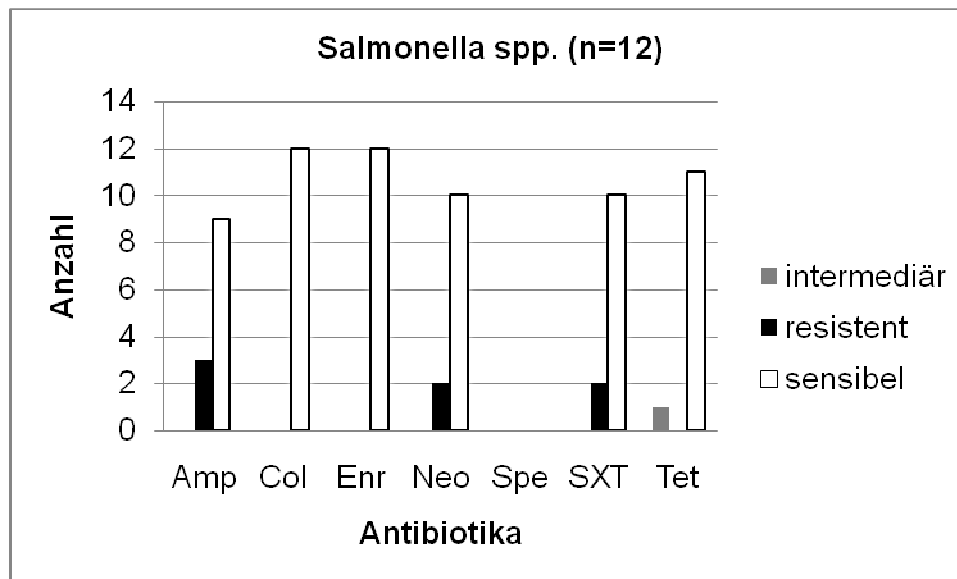


Abbildung 24: Ergebnisse Agardiffusion, *Salmonella* spp.

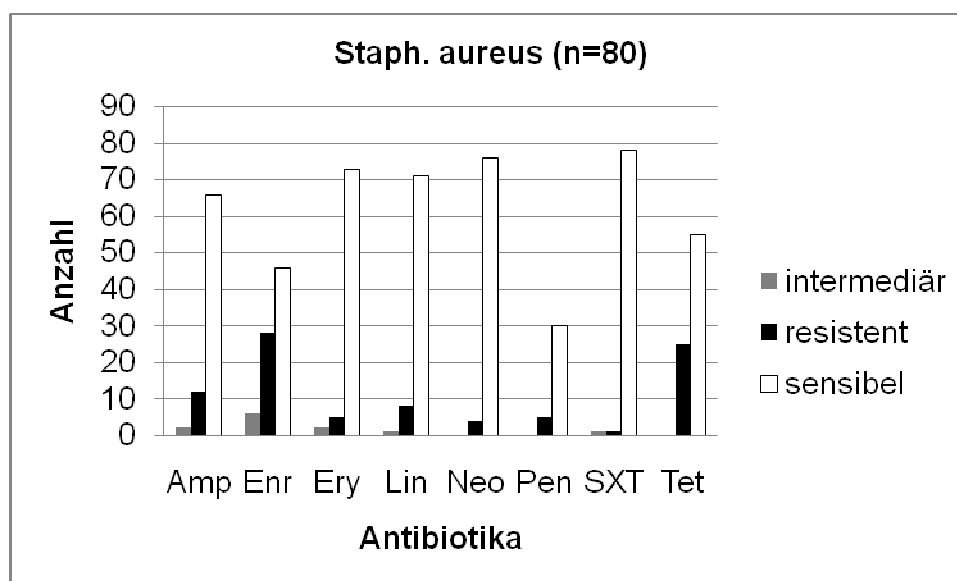


Abbildung 25: Ergebnisse der Agardiffusion, *Staph. aureus*

4.2 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Von insgesamt 556 bakteriellen Isolaten wurde die MHK von 12 verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode ermittelt. Auf Basis der quantitativen MHK-Werte wurde unter Verwendung von Grenzwerten (break points) eine qualitative Einteilung in sensibel, intermediär und resistent vorgenommen, um diese Ergebnisse denen der Agardiffusion gegenüberzustellen zu können. Eine Auflistung der getesteten Bakterienisolate zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: Keimspektrum in der Bouillon-Mikrodilution

Anzahl	Bakterien	Anzahl	Bakterien	Anzahl	Bakterien
3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	<i>Pseudomonas putida</i>
1	<i>Aeromonas sobria</i>	24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	<i>Pseudomonas spp.</i>
2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	<i>Klebsiella spp.</i>	12	<i>Salmonella spp.</i>
152	<i>Enterococcus spp.</i>	1	<i>Mannheimia haemolytica</i>	77	<i>Staphylococcus aureus</i>
212	<i>Escherichia coli</i>	23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	<i>Streptococcus spp.</i>
19	Katalase/Gram positive Kokken	11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
2	<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>		

4.2.1 Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration

In Tabelle 13 sind die MHK_{50} und MHK_{90} der wichtigsten getesteten Bakteriengruppen bezüglich der verschiedenen Wirkstoffe aufgeführt. Diese Werte bezeichnen die MHK bei welcher 50 bzw. 90 % aller getesteten Bakterienstämme *in vitro* kein Wachstum mehr zeigen. Die Daten sind nach Bakterien und Antibiotika sortiert aufgeführt.

Eine Auflistung und Verteilung aller erhobenen MHK-Werte der bedeutenden Bakteriengruppen zeigen die Tabellen 21 bis 26 im Anhang.

4.2.2 Resistenzlage

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung von Bakterien mittels Bouillon-Mikrodilution sind im Anhang in den Tabellen 17 bis 20 aufgeführt. Von insgesamt 252 grampositiven und 304 gramnegativen Isolaten erfolgte die Bestimmung der qualitativen Empfindlichkeit auf Basis der MHK-Bestimmung. Getestet wurde die Sensibilität gegenüber 12 verschiedenen Wirkstoffen.

Die meisten der getesteten grampositiven Bakterien zeigten sich sensibel gegenüber Ampicillin (87,7%) und Penicillin (86,9%). *Staph. aureus* ist besonders sensibel auf Neomycin (98,7%) und Clindamycin (94,8%). Für *Enterococcus spp.* war bei 96,1 % der Isolate eine Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin gegeben.

Tabelle 13: MHK₅₀ und MHK₉₀ der getesteten Bakterien (in µg/ml)

<i>Enterococcus spp.</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	0,5	1
Clindamycin	> 4	> 4
Enrofloxacin	1	2
Erythromycin	8	> 8
Neomycin	> 32	> 32
Penicillin	2	4
Spectinomycin	128	>128
Tetracyclin	16	> 16
Tiamulin	> 32	> 32
Tilmicosin	> 32	> 32
SXT	≤ 0,25/4,75	≤ 0,25/4,75

<i>Staph. aureus</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	≤ 0,125	8
Clindamycin	≤ 0,25	≤ 0,25
Enrofloxacin	0,125	> 2
Erythromycin	1	2
Neomycin	≤ 8	≤ 8
Penicillin	≤ 0,063	8
Spectinomycin	128	>128
Tetracyclin	≤ 1	> 16
Tiamulin	≤ 4	≤ 4
Tilmicosin	8	> 32
SXT	≤ 0,25/4,75	≤ 0,25/4,75

<i>E. coli</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	4	> 32
Colistin	≤ 0,5	≤ 0,5
Enrofloxacin	0,25	0,5
Neomycin	≤ 8	32
Spectinomycin	64	> 128
Tetracyclin	2	> 16
Tiamulin	> 32	> 32
SXT	≤ 0,25/4,75	> 4/76

<i>Pseudomonas spp.</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	> 32	> 32
Colistin	≤ 0,5	≤ 0,5
Enrofloxacin	1	2
Neomycin	≤ 8	16
Spectinomycin	128	> 128
Tetracyclin	16	> 16
Tiamulin	> 32	> 32
SXT	4/76	> 4/76

<i>Klebsiella spp.</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	32	> 32
Colistin	≤ 0,5	≤ 0,5
Enrofloxacin	≤ 0,063	0,125
Neomycin	≤ 8	≤ 8
Spectinomycin	32	64
Tetracyclin	2	> 16
Tiamulin	> 32	> 32
SXT	≤ 0,25/4,75	2/38

<i>Salmonella spp.</i>	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ampicillin	1	> 32
Colistin	≤ 0,5	≤ 0,5
Enrofloxacin	≤ 0,063	≤ 0,063
Neomycin	≤ 8	≤ 8
Spectinomycin	128	128
Tetracyclin	≤ 1	2
Tiamulin	> 32	> 32
SXT	≤ 0,25/4,75	> 4/76

Eine besonders ausgeprägte Resistenz der grampositiven Keime war gegenüber Spectinomycin, und von Enterokokken gegenüber Tiamulin und Tilmicosin festzustellen. Gramnegative Bakterien zeigten sich überwiegend sensibel gegenüber Colistin (94,4%) und Enrofloxacin (91%). Nur 58,5 % der *E. coli*-Isolate waren

sensibel gegenüber Enrofloxacin. Gegenüber Neomycin erwiesen sich 78 % der *Pseudomonas* – Isolate als sensibel. Weiterhin zeigten sich *Klebsiella spp.* und *Pseudomonas spp.* resistent gegenüber Ampicillin. Gegenüber Tiamulin besteht eine nahezu vollständige Resistenz in diesem Keimspektrum.

4.3 Ergebnisse von Agardiffusion und Mikrodilution im Vergleich

Alle mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten Bakterien wurden parallel auch mit dem Agardiffusionstest auf deren Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. Die qualitativen Ergebnisse von Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode werden in den Tabellen 27 bis 33 im Anhang als Kreuztabellen gegenübergestellt. Tabelle 27 zeigt den Vergleich im Hinblick auf die verwendeten Wirkstoffe. Für Spectinomycin liegen keine vergleichenden Ergebnisse vor. Die Ergebnisse von Lincomycin im Agardiffusionstest wurden denen von Clindamycin als Stellvertretersubstanz der Lincosamide (siehe 2.4.5 Tabelle 6) in der Bouillon-Mikrodilution gegenübergestellt. In den Tabellen 28 bis 32 sind die Ergebnisse für die wichtigen Bakteriengruppen *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Staph. aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* und *Salmonella spp.* einzeln im Vergleich dargestellt. Nicht weiter differenzierte katalasepositive Kokken, sowie Bakterien, wovon nur einzelne Isolate getestet wurden, sind nicht aufgeführt.

In den Abbildungen 26 bis 32 sind prozentual die Anteile identischer wie unterschiedlicher Ergebnisse beider Tests dargestellt. Unterschiedliche Ergebnisse werden je nach Grad der Abweichung als geringe (minor error), große (major error) und sehr große (very major error) Fehler bezeichnet (siehe hierzu auch 2.4.4).

Beim Vergleich der nach Antibiotika zusammengefassten Ergebnisse ist lediglich bei Penicillin eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Testmethoden gegeben. Die größten Abweichungen zeigen sich bei Erythromycin mit 45,6 % und bei Enrofloxacin mit 20,1 % „minor error“ aufgrund häufiger intermediärer Ergebnisse. Am häufigsten kommt es bezüglich Neomycin zu schwerwiegenden Abweichungen (insgesamt 14,6 %). Bei Ampicillin, Colistin, den Lincosamiden, Penicillin, SXT und Tetracyclin können jeweils insgesamt weniger als 10 % methodenbezogene Abweichungen festgestellt werden. Nur bei Neomycin und SXT kommen „major error“ und „very major error“ zusammen bei über 5 % der Tests vor.

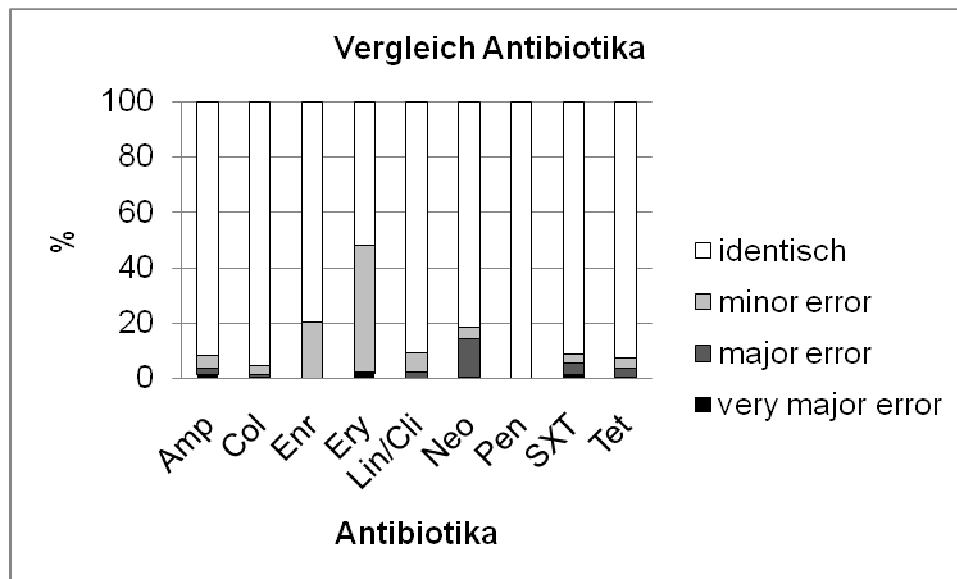


Abbildung 26: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; Antibiotika

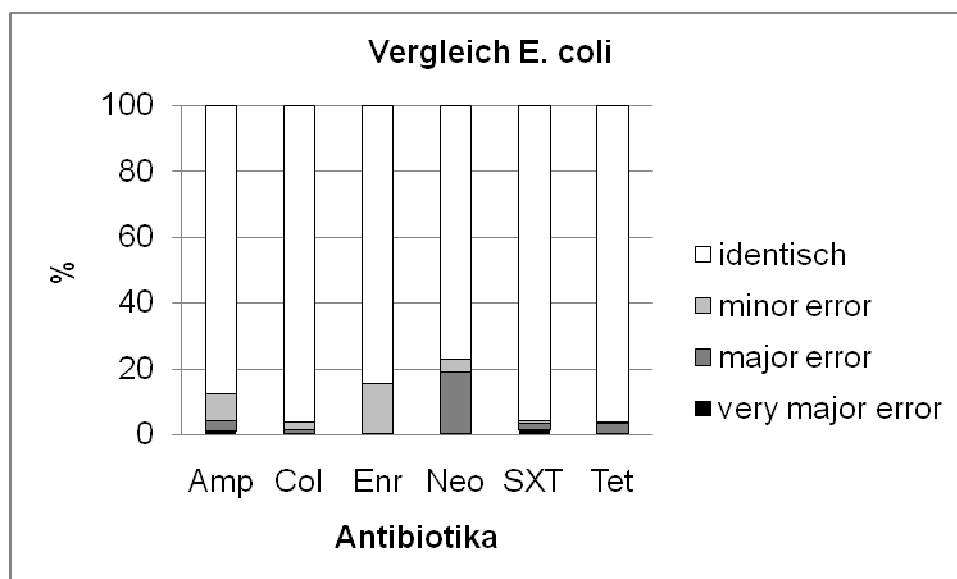


Abbildung 27: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *E. coli*

Bei der vergleichenden Untersuchung von *E. coli* beträgt der Anteil unterschiedlicher Ergebnisse für die Empfindlichkeitsprüfung von Colistin, SXT und Tetracyclin je weniger als 5 %. Bei Enrofloxacin kommt es wegen der intermediären Ergebnisse zu einem „minor error“ von 15,1 % und bei Neomycin zu einem „major error“ von 18,4

%. Der Anteil sehr großer Fehler ist bei der Gegenüberstellung der SXT-Ergebnisse mit 1,4 % am größten.

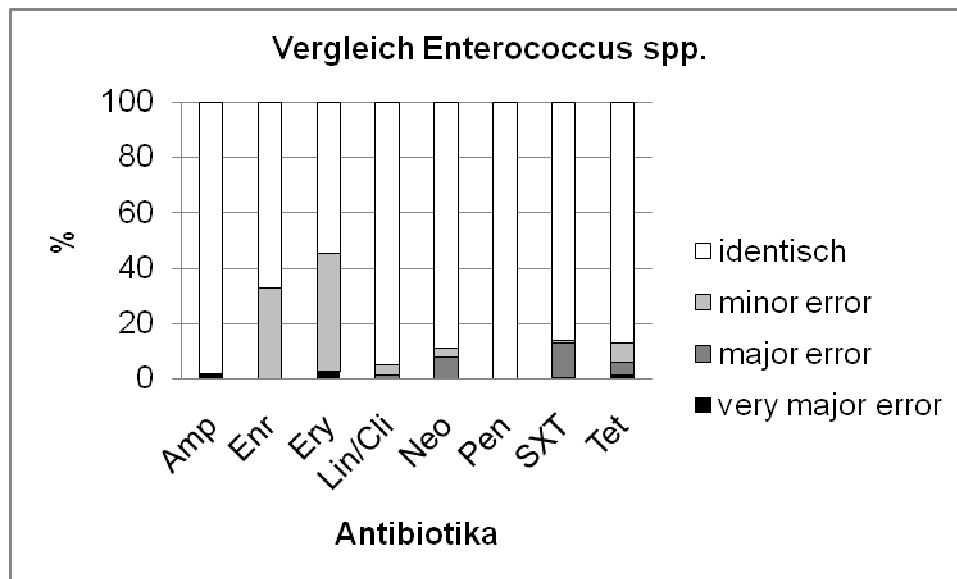


Abbildung 28: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *Enterococcus spp.*

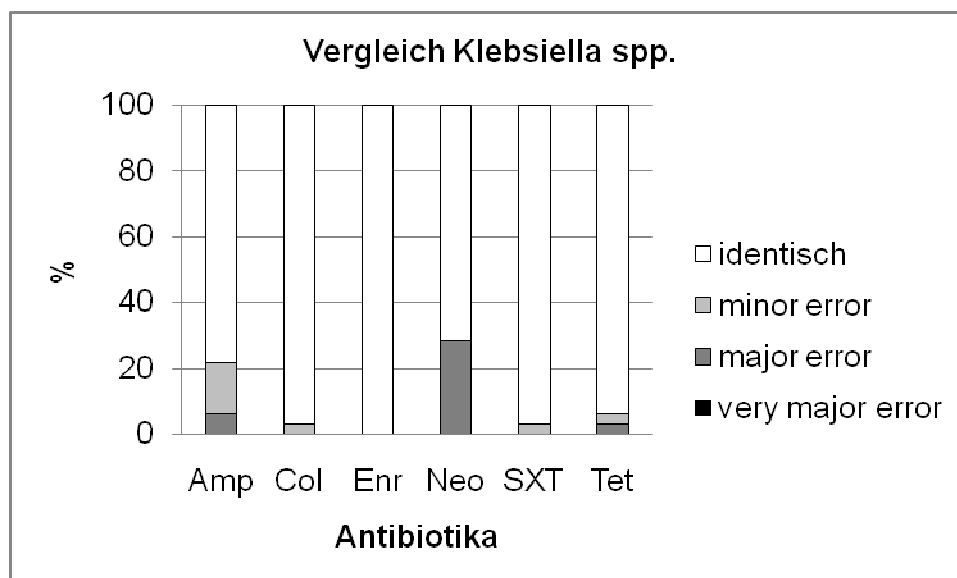


Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *Klebsiella spp.*

Bei der Gegenüberstellung der Testergebnisse von *Enterococcus spp.* sind die Anteile kleiner Fehler bei Enrofloxacin mit 32,9 % und bei Erythromycin mit 42,8 % am ausgeprägtesten. Große und sehr große Fehler zusammen, die bei SXT über 13 % der Fälle ausmachen, liegen bei den übrigen Antibiotika durchweg unter 10%.

Bei der vergleichenden Untersuchung von *Klebsiella spp.* zeigen sich größere Abweichungen bei Ampicillin und bei Neomycin. Für Ampicillin beträgt der Anteil kleiner Fehler 15,6 % und für Neomycin der Anteil großer Fehler 28,2 %.

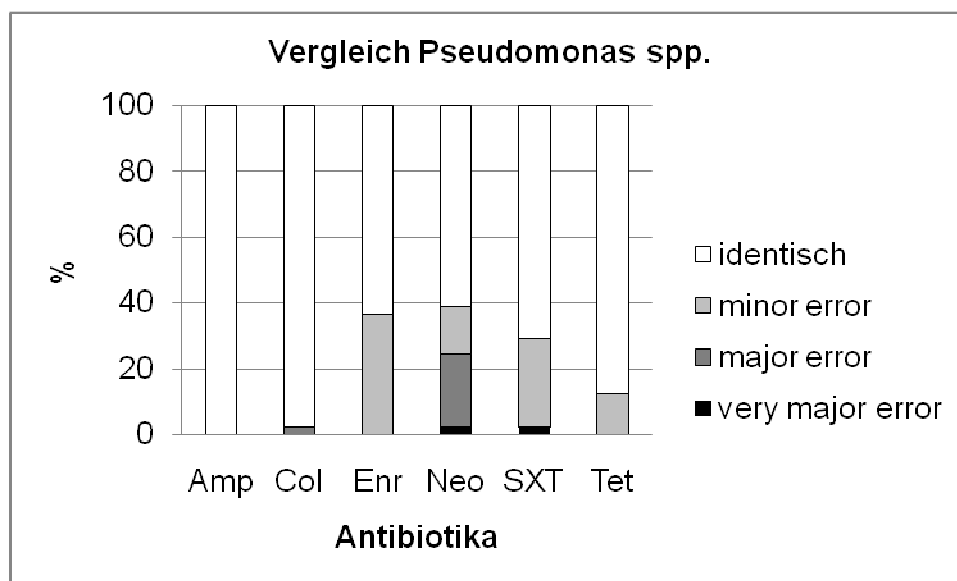


Abbildung 30: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *Pseudomonas spp.*

Bei der Testung von *Pseudomonas spp.* treten bei Ampicillin keine Abweichungen und bei Colistin nur 2,4 % kleine Fehler auf. Bei den übrigen getesteten Antibiotika beträgt die Fehlerquote zwischen 12,2 und 39 %. Der „major error“ ist dabei für Neomycin mit einem Anteil von 22,0 % am größten.

Bei den 12 untersuchten *Salmonella spp.* - Isolaten gab es Abweichungen der beiden Empfindlichkeitstests nur bezüglich Neomycin mit einem „major error“ in 16,7 % und Tetracyclin mit einem „minor error“ in 8,3 % der Fälle.

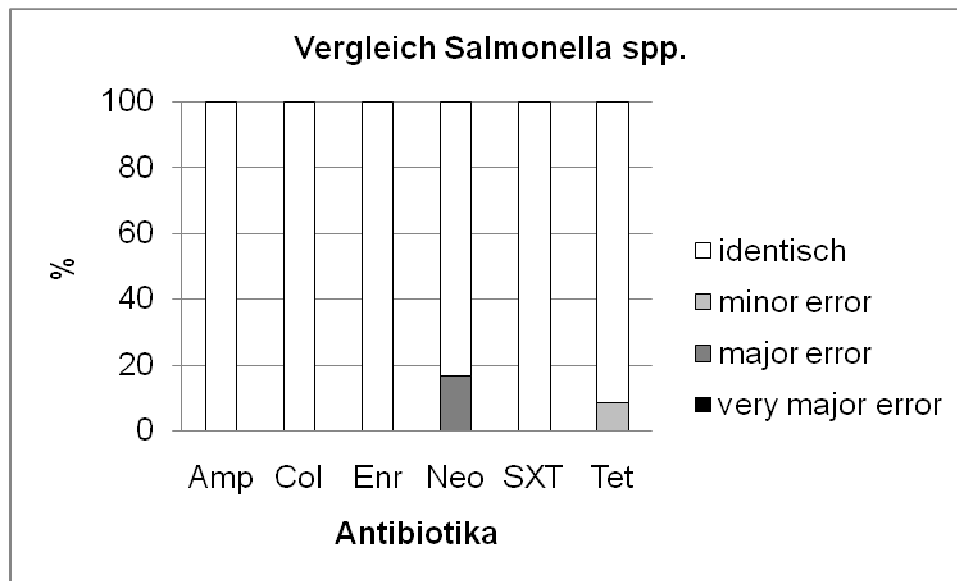


Abbildung 31: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *Salmonella sp*

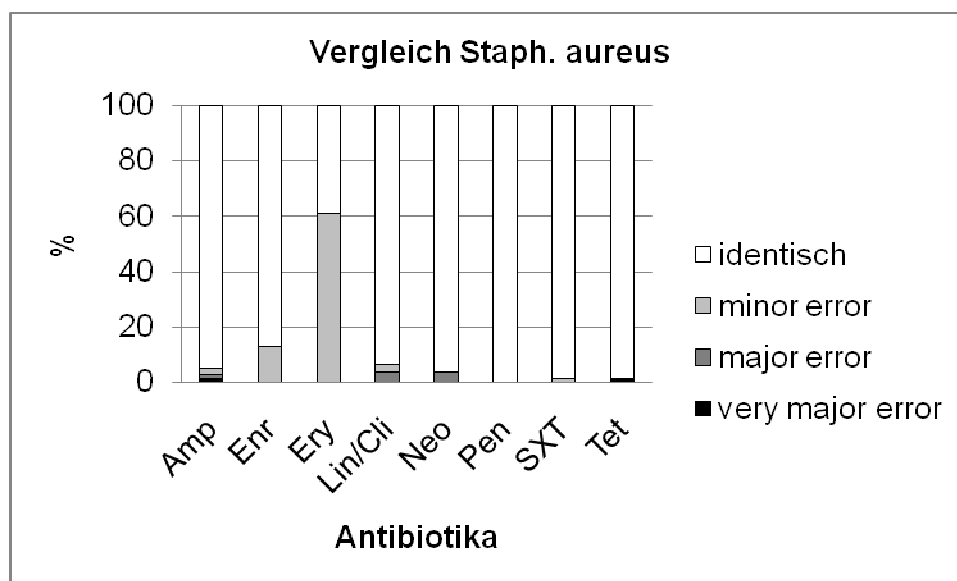


Abbildung 32: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; *Staph. aureus*

Die Testergebnisse für *Staph. aureus* zeigen für Erythromycin einen Anteil kleiner Fehler in 61 % und für Enrofloxacin in 13 % der Fälle. Für Neomycin, Penicillin, SXT und Tetracyclin liegt die gesamte Fehlerrate unter 5 % und für Ampicillin und die

Lincosamide nur knapp über 5 %. Ein „very major error“ kommt mit 1,3 % der Fälle nur bei der Testung von Ampicillin vor.

Als Gradmesser für die Übereinstimmung der Ergebnisse aus den beiden durchgeführten Methoden sind zu den einzelnen Antibiotika in Tabelle 14 die jeweiligen Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) und Cohen`s Kappa angegeben, mit Ausnahme von Colistin und Neomycin, wo aufgrund fehlender intermediärer Werte im Agardiffusionstest Cohen`s Kappa nicht ermittelt wurde.

Tabelle 14: Korrelationskoeffizient und Cohen`s Kappa als Grad der Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse beider Methoden

Antibiotika	Korrelationskoeffizient (nach Spearman)	<i>Cohen`s Kappa</i>
Ampicillin	0,891	0,834
Colistin	0,481	<i>Nicht berechnet</i>
Enrofloxacin	0,726	0,642
Erythromycin	0,727	0,302
Lincosamide	0,915	0,821
Neomycin	0,714	<i>Nicht berechnet</i>
Penicillin	1,0	1,0
SXT	0,857	0,794
Tetracyclin	0,908	0,859

4.4 Ergebnisse der Referenzstammführung

Als Kontrolle der korrekten Durchführung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode wurden in der Studie insgesamt 37mal *Escherichia coli* DSM 1103 (ATCC 25922) und 38mal *Staphylococcus aureus* DSM 2569 (ATCC 29213) getestet. Dabei trat beim *E. coli*-Stamm nur einmal ein Problem mit der Dichte des Inokulums auf. Aufgrund der zu geringen Koloniezahl auf der Kontrollplatte musste von einer zu geringen Bakteriendichte im Inokulum ausgegangen werden. Was das Wachstum anbelangte, so lagen alle ermittelten MHK-Werte im Referenzbereich. Die Bakteriendichte, die bei den darauffolgenden Tests ermittelt wurde, war wieder ohne Abweichung. Bei den Tests mit dem *Staphylococcus aureus* - Referenzstamm wurde zweimal ein zu hoher MHK-Wert für Erythromycin festgestellt, welcher jedesmal um eine Konzentrationsstufe höher lag als der Referenzbereich vorgab. Dabei lag in einem Fall zusätzlich

auch die MHK für Enrofloxacin um eine Konzentrationsstufe zu hoch. Bei einer einzelnen Testdurchführung mit dem *Staph.aureus* - Referenzstamm konnte die MHK von Ampicillin und von Penicillin aufgrund eines nicht interpretierbaren Wachstums nicht ermittelt werden. Dabei waren in diesem Test die dazugehörigen Kontrollplatten für Reinheit und Dichte des Inokulums in Ordnung. Derselbe Umstand trat in einem anderen Fall im Zusammenhang mit Tilmicosin auf. Insgesamt kam es bei der Bouillon-Mikrodilution also in fünf von 75 Referenztests, das entspricht 6,7 %, zu sieben Fehlern. Alle wiederholten und unmittelbar darauffolgenden Prüfungen mit Referenzstämmen waren im Ergebnis ohne Beanstandung.

Zur Durchführungskontrolle des Agardiffusionsverfahrens wurde 62mal mit *Escherichia coli* DSM 1103 (ATCC 25922) und 35mal mit *Staphylococcus aureus* DSM 1104 (ATCC 25923) getestet. Das einzige Problem das bei der Testung des *E. coli* Referenzstammes auftrat, bestand in einem zu geringen Hemmhof-durchmesser um das Enrofloxacin-Testplättchen. Sechsmal war der Hemmhofdurchmesser geringfügig zu klein. Eine Ursache hierfür konnte nicht festgemacht werden. Damit waren 6,2 % der Referenztest im Agardiffusionsverfahren fehlerhaft. Aber alle wiederholten und unmittelbar darauffolgenden Prüfungen mit Referenzstämmen waren im Ergebnis wieder ohne Beanstandung.

5 Diskussion

5.1 Besprechung der Testdurchführung

Die methodische Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen erfolgte auf der Basis der Vorschriften nach CLSI (NCCLS 2002 u. 2004). Aufgrund technischer und organisatorischer Gegebenheiten wurden dabei einzelne Abweichungen von Standardprotokoll vorgenommen. Zum einen wurde das für den Agardiffusionstest hergestellte Inokulum nicht mit einem Tupfer, sondern mit einer Pipette auf die MH-Agarplatte aufgebracht und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig darauf verteilt. Durch das Pipettieren von 100 µl der Bakteriensuspension auf die Agarplatte, in Anlehnung an die von der AVID (1998) beschriebene Direkt-Methode, war eine einheitliche Durchführung des Agardiffusionstests auch dann gegeben, wenn es von LabormitarbeiterInnen abwechselnd ausgeführt wurde. Des Weiteren wurden die so beimpften Agar- und Mikrotiterplatten aufgrund der im Labor bestehenden technischen Voraussetzungen bei 36 °C anstatt bei, nach CLSI beschriebenen, 35 °C bebrütet. Sowohl nach Herstellerangaben (MERLIN 2004), als auch nach dem Prüfprotokoll zur Bouillon-Mikrodilution der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“, das auf den Vorgaben der CLSI (NCCLS 2002) beruht, wird ein Temperaturbereich für die Inkubation von 35 – 37 °C angegeben (DVG 2004). Problematisch erscheint die Verwendung nicht indikations- und/oder tierartspezifischer Grenzwerte für die Empfindlichkeitstestung. Hier bedeutet dies, dass es bislang nur für Enrofloxacin geflügelbezogene Vorgaben für Infektionen mit *E. coli* und *Pasteurella multocida* gibt (NCCLS 2004). Dies hat sich auch mit der aktuellen Neuauflage der CLSI-Standards (CLSI 2008) nicht geändert. Um sich dennoch ein Bild zur Wirksamkeit anderer antibakteriell wirksamer Stoffe machen zu können, musste daher auf Grenzwerte für andere Indikationen der Tier- und Humanmedizin zurückgegriffen werden. Da nicht für alle getesteten antibiotischen Wirkstoffe Bezugsgrößen für die qualitative Einordnung der ermittelten Hemmhofdurchmesser nach den CLSI Vorgaben zur Verfügung standen (NCCLS 2004), wurde für die Grenzwerte von Neomycin, Colistin und Lincomycin auf die diesbezüglichen Grenzwertvorschläge der DVG (AVID 1997, AVID 1999) zurückgegriffen. Diese Entlehnung von Grenzwerten aus verschiedenen Arbeitsanweisungen ist grundsätzlich kritisch zu betrachten, da trotz genereller

Ähnlichkeit der Verfahren z. B. Unterschiede in der Dichte des zu erzielenden Bakterienrasens bestehen (AVID 1998, NCCLS 2002), welche zu unterschiedlich starkem Bakterienwachstum und zu einer dadurch differierenden Ausprägung der Hemmhöfe führen kann. Da die CLSI - Vorschriften ein stärkeres konfluierendes Wachstum des Bakterienrasens und die DVG - Normen ein schwächeres Wachstum in nichtkonfluierenden Kolonien fordern, ist bei Durchführung der Tests nach CLSI-Standards unter Verwendung von Hemmhöfen der DVG - Normen zu erwarten, dass es eher zu falsch - resistenten als zu falsch - sensiblen Ergebnissen kommen könnte. Das heißt zwar, dass ein wirksames Antibiotikum ggf. aufgrund eines falsch-resistenten Ergebnisses keinen medizinischen Einsatz findet, aber auch, dass die therapeutische Verwendung eines nicht wirksamen Antibiotikums eher vermieden wird. Weiterhin wurde für die Beurteilung des Hemmhofes um Neomycin kein intermediärer Bereich verwendet, da dieser so gering ausfällt, dass ein Ablesen auch mit Schablone schwierig und unzuverlässig gewesen wäre. Stattdessen wurden alle Hemmhöfe mit einem HHD von mindestens 17 mm als sensibel und alle die kleiner ausfielen als resistent gewertet.

MHK-Werte sind quantitative und damit vergleichbare Werte, die üblicherweise in der Einheit $\mu\text{g/ml}$ angegeben werden (NCCLS 2002, DIN 2000b, AVID 1999). Sofern davon ausgegangen werden kann, dass verschiedene Durchführungsvorschriften, welche zur MHK - Bestimmung herangezogen werden können, zu korrekten MHK - Werten führen, sind die auf unterschiedliche Weise ermittelten MHK vergleichbar. Das lässt den Schluss zu, dass die qualitative Einteilung von methodenverschieden erstellten MHK - Werten in resistent, intermediär und sensibel vorgenommen werden kann und hierzu auch „break points“ aus unterschiedlichen Quellen Verwendung finden.

Fehlende indikationsbezogene und vogelspezifische Grenzwerte sind nach wie vor ein großes Problem für eine fundierte Durchführung und Interpretation von Empfindlichkeitstests von Bakterien des Geflügels.

Die praktische Durchführung des Agardiffusionstest, sowie der Bouillon-Mikrodilution erwies sich als weitestgehend unproblematisch. Die Bouillon-Mikrodilution war dabei zeit-, material- und kostenintensiver als der Agardiffusionstest. Das visuelle Ablesen der Testergebnisse bereitete weder beim Agardiffusionstest noch bei der Bouillon-Mikrodilution Probleme.

5.2 Besprechung der Ergebnisse der Agardiffusion

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Agardiffusionstest zeigen ein heterogenes Bild der Resistenzsituation der verschiedenen Bakteriengruppen. Die Aussagekraft der Ergebnisse bezüglich der Resistenzsituation bakterieller Keime des Wirtschaftsgeflügels ist abhängig vom Umfang der jeweils getesteten Bakterienisolate. *E. coli* und *Enterococcus spp.* wurden mit 1325 bzw. 742 getesteten Stämmen am häufigsten untersucht, sodass die hieraus gewonnenen Ergebnisse am aussagekräftigsten sind. Auch die Untersuchungen von *Staph. aureus* mit 80, *Klebsiella spp.* mit 55 und *Pseudomonas spp.* mit 53 Stämmen liefern relevante Ergebnisse. Die getesteten grampositiven, katalasepositiven Kokken geben mit 129 untersuchten Isolaten einen Überblick über das Resistenzverhalten dieser Bakteriengruppe, zu welcher v. a. Staphylokokken und Mikrokokken gehören. Die mit 12 Untersuchungen geringe Anzahl getesteter *Salmonella* – Stämme erlaubt lediglich die Ableitung eines Trends der Resistenzlage dieser Bakterien.

Die Resistenzlage grampositiver Bakterien stellt sich gegenüber Ampicillin und Penicillin relativ gut dar. Aber auch SXT zeigt sich gegenüber diesem Keimspektrum als häufig wirksame Alternative. Die, prozentual gesehen, bessere Resistenzlage von *Staph. aureus* gegenüber Penicillin im Vergleich zu Ampicillin beruht auf der statistischen Auswertung. Es wurden nur 35 von insgesamt 80 *Staph. aureus* – Isolaten auf die Empfindlichkeit gegenüber Penicillin getestet. Es gab aber kein Isolat unter diesen, das gegenüber Penicillin sensibel und gegenüber Ampicillin resistent gewesen ist. Trotz der offensichtlich guten Empfindlichkeit von *Staph. aureus* und anderen katalasepositiven Kokken bezüglich Neomycin, muss bei der Anwendung dieses Aminoglykosids beachtet werden, dass nach einer enteralen Gabe kaum eine Resorption erfolgt (KROKER 2002).

Mit 98,5 % sensiblen Isolaten gramnegativer Bakterien zeigt sich eine hervorragende Resistenzsituation für Colistin. Kein anderes getestetes Antibiotikum zeigte innerhalb dieses Keimspektrums eine ähnlich gute Wirkung. Doch bei enteraler Verabreichung ist die Resorption von Colistin nur gering (KROKER 2002), sodass hier indikationsabhängig auf andere Wirkstoffe zurückgegriffen werden muss. Die Resistenzlage gramnegativer Bakterien ist aber im Übrigen als unsicher zu betrachten.

Die vorliegenden Daten geben den behandelnden Tierärzten in den Fällen, in denen noch kein Antibiotogramm zur Verfügung steht, eine Entscheidungsgrundlage für die Auswahl geeigneter Wirkstoffe für die antibiotische Behandlung von Geflügelbeständen.

Den Ergebnissen der Agardiffusionstests zufolge kann für keinen der untersuchten antibiotischen Wirkstoffe eine uneingeschränkte Wirksamkeit angenommen werden. Die Bakteriengruppen unterscheiden sich z.T. deutlich in der ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit. Daher wird durch die vorliegenden Ergebnisse die Notwendigkeit der Wirksamkeitskontrolle von Antibiotika gerade auch bei der Behandlung von Nutzgeflügelbeständen mittels *in-vitro*-Empfindlichkeitstests bestätigt.

5.3 Besprechung der Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution

Für die qualitative Einteilung der MHK-Ergebnisse in intermediär, sensibel und resistent anhand festgelegter Grenzwerte, sogenannter „break points“, reicht meist die Testung von 2 bis 3 Konzentrationsstufen des entsprechenden Wirkstoffes aus (NCCLS 2004, SCHWARZ et al. 2003).

Trotz kommerziell erhältlicher Mikrotiterplatten, die für die Empfindlichkeitstestung von Bakterien beim Geflügel konzipiert sind (REBESKI und SCHEDLETZKY 2003), wurde eine Platte zur Testung ausgewählt (MICRONAUT-S Großtiere, E1-792-100, MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel), welche dem Layout nach zur Empfindlichkeitstestung bakteriell Erreger von Großtieren konzipiert war (LUHOFER 2004). Dies geschah aus der Überlegung heraus, möglichst viele Konzentrationsstufen der zu testenden Wirkstoffe auf der Platte vorliegen zu haben. Eine Aussage über die tatsächliche MHK von Bakterien kann nur dann getroffen werden, wenn diese nicht außerhalb des auf der Platte erfassten Bereiches von verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen liegt. Da TierärztInnen nur dann unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Parameter abschätzen können, ob mit einem Wirkstoff eine ausreichend hohe Konzentration genügend lange zur Bekämpfung der Erreger am Zielort möglich ist, wie es von SCHWARZ et al (2003) angedacht wird, wenn die MHK bekannt ist, müssen die zu testenden Antibiotika in einer genügend großen Anzahl an Konzentrationsstufen getestet werden.

Obwohl die MHK_{90} von *Staph. aureus* für Ampicillin bei 8 µg/ml relativ hoch ist, liegen fast 80 % der Stämme im sensiblen Bereich von $\leq 0,25$ bis 0,5 µg/ml. Gleiches gilt für Penicillin. Damit zeigt sich hier eine höhere Sensibilität gegenüber β -Lactam-

Antibiotika als bei WALLMANN (2007). Da deutlich mehr als 90 % aller *Staph. aureus* - Isolate sensibel gegenüber Neomycin, SXT, Clindamycin als Lincosamid und Tiamulin waren, ergibt sich eine relativ gute Ausgangslage für die antibiotische Behandlung von *Staph. aureus* - Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel.

Mit einer MHK_{90} von 1 µg/ml für Ampicillin und 4 µg/ml für Penicillin ist die Empfindlichkeit von *Enterococcus spp.* gegenüber diesen β - Lactamen sehr hoch. Eine ähnlich gute Resistenzsituation besteht gegenüber SXT. Die übrigen getesteten Antibiotika zeigen eine mäßige bis schlechte Wirksamkeit gegen Enterokokken.

Für die getesteten *E. coli* - Stämme wurde eine MHK_{90} von $\leq 0,5$ µg/ml und damit eine Sensibilität gegenüber Colistin nachgewiesen. Außer Neomycin führten alle anderen Wirkstoffe zu einer unzureichenden Wirkung. Zu beachten ist, dass *E. coli* zwar in weniger als 60 % der Fälle sensibel gegenüber Enrofloxacin war, jedoch die MHK_{90} bei 0,5 µg/ml lag, also nur eine Konzentrationsstufe oberhalb des sensiblen Bereiches. Die Verabreichung einer erhöhten Wirkstoffdosis könnte hier also in einigen Fällen zu einer wirksamen Antibiotikatherapie führen. Die Ergebnisse für Enrofloxacin und für SXT, mit jeweils weniger als 60 % sensiblen Isolaten, zeigen eine schlechtere Resistenzsituation für *E. coli* als bei WALLMANN (2007), der tierartabhängig 79,9 bis 93,8 % bzw. 66,0 bis 90,5% Sensibilität beschrieben hat. SCHMIED (2007) hatte bei über 95 % der *E. coli*-Stämme von Legehennen eine Sensibilität gegenüber Enrofloxacin festgestellt. Da in der vorliegenden Arbeit die getesteten *E. coli* - Isolate ausschließlich von Mastküken stammten, könnten Gründe für die unterschiedlichen Resultate in den verschiedenen Haltungsformen zu finden sein.

Es konnte mit einer MHK_{90} von $\leq 0,5$ µg/ml für *Pseudomonas spp.* nur gegenüber Colistin eine gute Empfindlichkeit festgestellt werden. Zwar erwies sich lediglich ein Isolat als völlig resistent gegenüber Enrofloxacin, dennoch lag die MHK_{50} bei 1 µg/ml, also im intermediären Bereich, sodass vermutlich nur durch eine erhöhte Dosierung ein Therapieerfolg zu erwarten wäre. Insgesamt ergibt sich aber eine ungünstige Resistenzlage für *Pseudomonas spp.* vom Geflügel, was das Ergebnis früherer Untersuchungen (WALLMANN 2007) bestätigt.

Für *Klebsiella spp.* ergibt sich eine relativ gute Resistenzlage. Fast alle getesteten Stämme waren sensibel gegenüber Enrofloxacin, Colistin und Neomycin. Mit einer MHK_{50} von 8 µg/ml und MHK_{90} von >32 µg/ml ist Ampicillin nahezu unwirksam.

Da nur 12 *Salmonella*-Isolate getestet wurden, können diese Ergebnisse nur einen Eindruck vom Resistenzverhalten dieser Bakteriengattung liefern. Dennoch erwies sich keines der Isolate als resistent gegen Colistin, Enrofloxacin, Neomycin und Tetracyclin. Spectinomycin ist dagegen fast unwirksam. Letztlich kann aber eine gute Empfindlichkeitslage für Salmonellen des Wirtschaftsgeflügels vermutet werden.

Eine Empfindlichkeit der getesteten gramnegativen Keime gegenüber Tiamulin ist kaum vorhanden, so dass diesem Wirkstoff für die Behandlung assoziierter Erkrankungen keine Bedeutung beigemessen wird. Eine problematische Resistenzlage aerober gramnegativer Bakterien wird gegenüber Spectinomycin beobachtet.

5.4 Vergleich zwischen Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution

Da es sich beim Agardiffusionstest und bei der Bouillon-Mikrodilutionsmethode um zwei Tests handelt, die sich in der praktischen Durchführung eindeutig unterscheiden, ist ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich. Dennoch wurden die qualitativen Ergebnisse beider Empfindlichkeitstests gegenübergestellt, um den Grad der Übereinstimmung oder Abweichung feststellen zu können. Betrachtet man alle erzielten Testergebnisse zusammen, unabhängig von den untersuchten Wirkstoffen und Bakterien, so haben 86,2 % absolut übereingestimmt. Bei weiteren 9,1 % war eines der beiden Testergebnisse intermediär („minor error“). Große Fehler („major error“) und sehr große Fehler („very major error“) traten zusammen also in weniger als 5 % der Fälle auf.

Mehr Aufschluss gibt der Vergleich in Abhängigkeit von den verwendeten Antibiotika und den untersuchten Bakteriengruppen.

Beim Vergleich der Testresultate in Abhängigkeit von den verwendeten Wirkstoffen (Abbildung 26) erkennt man die relativ geringen Abweichungen der Ergebnisse beider Tests. Eine Ausnahme bildet dabei Erythromycin mit nur 52 % Übereinstimmung und einem Cohen - Kappa - Koeffizienten von nur 0,302. Man muss hier aber beachten, dass bei einem „minor error“ von 45,6 % die Fehler häufig auf geringen Abweichungen basieren. Daher ist der Korrelationskoeffizient mit 0,714 relativ hoch. Ähnliches ist bei Enrofloxacin zu beobachten, wo 20,1 % kleine Fehler auftraten. Hieraus lässt sich die Bedeutung des intermediären Bereiches als Pufferzone zur Vermeidung falscher Einteilungen erkennen, wie es von TURNIDGE et al. (2007) beschrieben wird. Dass der Vergleich bezüglich Neomycin zu einem

„major error“ von 14,2 % führt, könnte damit zusammenhängen, dass bei der Beurteilung der Agardiffusionsergebnisse von Neomycin auf einen intermediären Bereich verzichtet wurde, da dieser als kaum ablesbar erschien. Sehr große Fehler, d. h. sensible Agardiffusionsergebnisse bei resistantem Ergebnis nach Bouillon-Mikrodilution, traten zu höchstens 2 % (bei Erythromycin) auf. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist für Colistin mit 0,481 zwar der niedrigste im Vergleich zu den anderen Antibiotika, der Anteil von 95,4 % identischen Testresultaten der beiden Methoden ist jedoch der höchste hinter Penicillin. Für Penicillin wurde eine vollständige Übereinstimmung der Testresultate festgestellt.

Insgesamt lässt sich eine große Korrelation der qualitativen Ergebnisse aus beiden Testmethoden feststellen.

Beim Vergleich der Testresultate, bezogen auf die Bakterienspezies, ergibt sich eine ähnliche Übereinstimmung. Ein „major error“ trat mit 28,2 % am häufigsten bei der Resistenztestung von *Klebsiella spp.* gegenüber Neomycin auf. Ein „minor error“ wurde in 61 % der Fälle bei der Testung von *Staph. aureus* bezüglich Erythromycin festgestellt. Die beste Übereinstimmung zeigten die Befunde aus Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode bei der Testung der 12 Salmonellen - Isolate. Bis auf die Abweichungen bei Neomycin und Tetracyclin, haben 100 % der parallel erzielten Ergebnisse übereingestimmt. Die größten Abweichungen zeigen dagegen die Empfindlichkeitsprüfungen von Pseudomonaden mit insgesamt 17,9 %.

5.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse sowohl des Agardiffusionstests als auch die der Bouillon-Mikrodilutionsmethode zeigen eine uneinheitliche Resistenzlage grampositiver und gramnegativer aerober Bakterien des Wirtschaftsgeflügels. Nur für wenige Indikationen kann eine relativ sichere Wirkung bestimmter Antibiotika angenommen werden. In der überwiegenden Zahl der Fälle ist es jedoch nicht möglich von einer pauschalen Sensibilität der Bakterien auszugehen. Antibiotikaresistenzen stellen u.a. ein Problem für die weitere antibiotische Therapie dar (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Besonders in Hinblick auf die Gefahr, die für Mensch und Tier von resistenten Bakterien ausgeht und dem damit verbundenen Problem des Verbraucherschutzes bei der Behandlung lebensmittelliefernder Tiere (siehe 2.3.4) ist es wichtig vor und während des therapeutischen Einsatzes von Antibiotika beim Wirtschaftsgeflügel, die Sensibilität der vermuteten oder nachgewiesenen

bakteriellen Erreger mittels geeigneter Methoden festzustellen. Nur so kann eine Behandlung sensibler Bakterien mit wirksamen Medikamenten sichergestellt werden, wie es für den gewissenhaften Einsatz von Antibiotika zur Vermeidung resistenter Keime gefordert wird (BTK ArgeVet 2000). Dies umso mehr, da nur eine begrenzte Anzahl von antibiotischen Wirkstoffen für die Verwendung beim Wirtschaftsgeflügel zugelassen ist (QS 2008, VETIDATA 2008) und eine Umwidmung nur im Therapienotstand unter Beachtung rechtlicher Vorgaben (ARZNEIMITTELGESETZ 2005) in Einzelfällen erfolgen kann. Die Bedeutung des Antibiotikaeinsatzes beim lebensmittelliefernden Nutzgeflügel bezüglich des Verbraucherschutzes wird bekräftigt durch die Tatsache, dass z. B. für das Jahr 2007 in Deutschland ein pro Kopf-Verbrauch von durchschnittlich 210 Eier und 18 kg Geflügelfleisch ermittelt wurde (BÖTTCHER und SCHMIDT 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden bakterielle Keime des Zier- und Rassegeflügels nicht berücksichtigt. Dennoch sollte beachtet werden, dass auch nichtlebensmittelliefernde Vögel als Quellen resistenter Bakterien, die auf den Menschen übergehen können, in Betracht kommen, und so erscheint es notwendig, dass Bakterien dieser Tiergruppe ebenfalls in ein regelmäßiges Resistenzmonitoring integriert werden. Es ist schon länger bekannt, dass auch das Keimspektrum von Ziervögeln eine unsichere Resistenzlage aufweisen kann (RAVELHOFER-ROTHENEDER 1999).

Was die erhobenen Daten zur Resistenzsituation bakterieller Keime des Wirtschaftsgeflügels anbelangt, so zeigen diese zum Teil deutliche Abweichungen zu anderweitig erhobenen Untersuchungsergebnissen (vergleiche 2.3.5 und 5.3). Daraus lässt sich folgern, dass ein Monitoring bakterieller Resistenzen nicht nur im nationalen oder internationalen Maßstab erfolgen sollte, sondern ebenso auf niederen Ebenen, wie zum Beispiel im Einzugsbereich einer Klinik oder Praxis, durchaus Sinn macht. Solche Untersuchungen erlauben eine aktuelle und praxisbezogene Einschätzung der Resistenzlage für die praktischen GeflügeltierärztInnen. Dabei spielt es keine große Rolle, ob die Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusionstest oder Bouillon-Mikrodilutionsmethode vorgenommen wird. Denn es wurde gezeigt, dass auch bei der Empfindlichkeitstestung von Bakterien des Wirtschaftsgeflügels die qualitativen Ergebnisse der beiden Methoden in hohem Maße übereinstimmen und eine gute Korrelation aufweisen. Somit ist es gerechtfertigt, dem einfachen und kostengünstigeren Agardiffusionstest seinen Platz in der Empfindlichkeitstestung zu belassen. Gerade bei der Erst- und

Notfalldiagnostik auf Klinik- und Praxisebene darf man nach wie vor auf diesen Test zurückgreifen. Dennoch bestätigen sich auch in dieser Arbeit die Vorzüge der MHK-Bestimmung, wie sie von SCHWARZ et al. (2003) zusammengefasst wurden. Aus den ermittelten MHK-Werten lässt sich genauso die qualitative Einteilung in intermediär, resistent und sensibel ableiten wie beim Agardiffusionstest. Zudem sind die quantitativen minimalen Hemmkonzentrationen jedoch besser vergleichbar, auch innerhalb verschiedener Untersuchungen. Dies erlaubt eine feinere und auch zukünftig noch eindeutig nachvollziehbare Einschätzung der Ausprägung und Entwicklung bakterieller Antibiotikaresistenzen. Dieser Vorteil besteht aber nur, wenn die untersuchten Antibiotika in einer möglichst großen Anzahl von Konzentrationsstufen getestet werden. Werden nur die zur qualitativen Einteilung notwendigen „breakpoint“-Konzentrationen untersucht, geht dieser Vorteil ggf. verloren, da sich, wie die Ergebnisse zeigten, der Bereich, auf welchen sich die ermittelten MHK-Werte verteilen, abhängig von Bakterienspezies und Antibiotika, über zehn Konzentrationsstufen und ggf. noch mehr erstrecken kann (siehe Tabellen 21 bis 26). Ein Problem, das unabhängig von der Methode besteht, ist das Fehlen geflügelspezifischer Grenzwerte für die Empfindlichkeitstestung von Bakterien. Folglich kann nie völlig ausgeschlossen werden, dass, die *in vitro* erzielten, Ergebnisse nicht mit den tatsächlichen Gegebenheiten übereinstimmen, zumal auch falsche Laborergebnisse auftreten können. Damit ergibt sich umso mehr die Notwendigkeit der Erarbeitung valider geflügelspezifischer Grenzwerte für eine aussagekräftige Resistenztestung, bei der speziesspezifische und indikationsbezogenen Faktoren berücksichtigt werden. Die genotypische Charakterisierung bakterieller Antibiotikaresistenzen, z. B. mittels PCR, hat bereits Einzug in die Resistenztestung von Keimen gehalten (siehe 2.4). Es ist aber derzeit noch nicht absehbar, ob oder wann genetische Methoden die bisherige Bestimmung der phänotypischen Empfindlichkeit z. B. mittels Agardiffusion oder Mikrodilution im veterinärmedizinischen Bereich ablösen können. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse über die Antibiotikaempfindlichkeit aerober Bakterien des Wirtschaftsgeflügels im Probeneinzugsbereich der Klinik für Vögel sollen im Notfall den einsendenden Tierärzten als eine Entscheidungsgrundlage für die antibiotische Erstversorgung erkrankter Bestände dienen. Dies entbindet sie jedoch nicht von einer Überprüfung der Wirksamkeit der Antibiose durch Erstellung eines Antibiogramms.

6 Zusammenfassung

Zur Beurteilung der Resistenzlage aerober Bakterien des Wirtschaftsgeflügels wurden von September 2006 bis April 2008 insgesamt 2462 bakterielle Isolate aus Routineuntersuchungen von Organ- und Tupferproben auf deren *in-vitro*-Resistenzverhalten gegenüber antibiotischen Wirkstoffen hin untersucht. Von den erfassten Bakterienstämmen stammten 2227 von Mastküken oder Broilern, und die übrigen von Legehennenküken, Legehennen, Peking- und Moschusenten. Mit dem Agardiffusionstest erfolgte eine qualitative Beurteilung der Keime als resistent, intermediär oder sensibel. Von einem Teil dieser Bakterien wurde parallel hierzu die Antibiotikaempfindlichkeit mittels Bouillon-Mikrodilution bestimmt. Dabei wurden die entsprechenden MHK-Werte erhoben und beurteilt. Die qualitativen Ergebnisse beider Testmethoden wurden verglichen. Die Testdurchführung erfolgte auf der Grundlage von CLSI-Vorgaben.

Im Ergebnis konnte ein Überblick über die aktuelle Antibiotikaempfindlichkeit bakterieller Keime des Wirtschaftsgeflügels im Einzugsbereich der Klinik für Vögel der LMU München erhoben werden. Unterschiede zu Ergebnissen anderweitiger Untersuchungen in Deutschland sind teilweise gegeben; so ergab sich in der vorliegenden Arbeit aus der MHK-Bestimmung für *E. coli* mit jeweils knapp 60 % sensiblen Isolaten eine höhere Resistenz gegenüber Enrofloxacin und Trimethoprim-Sulfamethoxacol, während sich *Staph. aureus* mit jeweils fast 80 % sensiblen Isolaten als deutlich empfindlicher gegenüber Ampicillin und Penicillin erwies. Es zeigt sich daher die Notwendigkeit Klinik- oder ggf. Praxiseigener Monitoringprogramme, um den behandelnden TierärztInnen für eine antibiotische Erst- oder Notfallbehandlung von Geflügelbestände eine geeignete Entscheidungsgrundlage geben und damit den Anforderungen an einen vernünftigen Antibiotikaeinsatz gerecht werden zu können. Ampicillin und Penicillin zeigten die breiteste Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien. Über 85 % der untersuchten Keime waren empfindlich gegenüber diesen Antibiotika. Bei gramnegativen Keimen erwies sich Colistin als das am häufigsten wirksame Antibiotikum, mehr als 94 % der Isolate wurden als sensibel beurteilt. Die Resistenzlage vieler Bakterien des Geflügels stellte sich jedoch als relativ unsicher heraus. Daher sind Resistenztests für eine wirksame antibiotische Behandlung von Nutzgeflügelbeständen unabdingbar. Nur so kann ein

falscher oder unnötiger Antibiotikaeinsatz vermieden und der Verbraucher vor resistenten Keimen tierischer Herkunft geschützt werden. Im Vergleich beider Testmethoden unterschieden sich die qualitativen Ergebnisse in 13,8 % der Fälle. In 9 % der Fälle lag ein kleiner Fehler (minor error) vor. Aufgrund der guten Korrelation der Ergebnisse wird gefolgert, dass sich beide Methoden gleichermaßen für die Resistenztestung bakterieller Keime des Geflügels eignen und einen Platz in der Routine- und Notfalldiagnostik haben. Die Problematik fehlender geflügelspezifischer Grenzwerte ist unabhängig von der Methode vorhanden. Die Bouillon-Mikrodilution zur Erhebung quantitativer und vergleichbarer MHK-Werte stellt aber die Methode der Wahl für das Resistenzmonitoring dar. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass eine möglichst große Anzahl an Konzentrationsstufen getestet werden sollte, da die erhobenen MHK-Werte zum Teil über einen großen Bereich verteilt lagen.

7 Summary

In order to evaluate the resistance situation of aerobic bacteria from poultry, a total of 2462 bacterial isolates from routine diagnostic of organ and swap samples collected between September 2006 and April 2008 were tested for their *in-vitro*-resistance to antibiotic substances. 2227 of the included bacterial strains originated from broilers or broiler chicks, and the rest from layer chicks and laying hens as well as from domestic and Muscovy ducks. The agar disk diffusion method was used for qualitative evaluation to classify the strains as resistant, intermediate or susceptible. A part of these bacteria was also tested for antimicrobial susceptibility by the broth microdilution method. Thereby the minimum inhibitory concentration values of the antibiotics were collected and evaluated. The qualitative results of both methods were compared. All test procedures were based on the CLSI performance standards. The results provide an overview of the current antibiotic susceptibility of bacterial strains from poultry in the catchment area of the Clinic for Birds of the LMU Munich. Differences to results of other studies in Germany were partially detected; in this survey the minimal inhibitory concentration values showed for example, that *E. coli* was more resistant to enrofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole each with just under 60 % susceptible isolates, but *Staph. aureus* was clearly more susceptible to ampicillin and penicillin each with nearly 80 % susceptible isolates. This demonstrates the necessity for veterinary clinics or practices to establish own local monitoring programs in order to have an appropriate background for their decisions for a first therapy or an emergency treatment and to satisfy requirements concerning the reasonable use of antibiotics. Grampositive bacteria have proved to be most susceptible to ampicillin and penicillin with over 85 % of the strains being susceptible. Gramnegative strains have been highly susceptible to colistin, more than 94 % of these bacteria were classified as susceptible. The resistance situation of many bacteria from poultry has turned out to be relatively uncertain. Therefore susceptibility testing is required for an efficient antibiotic therapy of poultry. Only in this way it is possible to avoid a wrong or unneeded use of antibiotics and to prevent customers from resistant bacteria from animals. The comparison of both test methods revealed a difference of the qualitative results in 13,8 % of the cases. In 9 % of the cases there has been a minor error. Because of the good correlation of the test

results it can be concluded, that both methods are equally suitable for susceptibility testing of bacteria from poultry and that they should have a place in routine and emergency diagnostic. However, the unavailability of poultry-specific break points is regarded as a major problem in susceptibility testing of antibiotics independent of the used method. The broth microdilution method providing quantitative and comparable results is regarded as the method of choice for resistance monitoring. This test however should be performed using multiple concentrations of antibiotic substances, because the collected minimal inhibitory concentration-values have partially been distributed over a large range.

8 Literaturverzeichnis

1. **ANDREWS J.M. (2001a):** The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 29 – 42
2. **ANDREWS J.M. (2001b):** BSAC standardized disc susceptibility testing method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 43 – 57
3. **ALTREUTHER P., A. BÖTTNER, M. SCHEER, P. SCHMID, W. TRAEDER, S. WEISKOPF (1997):** Anmerkungen zum Resistenzmonitoring in der Tiergesundheit. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 110, 418 – 421
4. **ARZNEIMITTELGESETZ (2005):** Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), zuletzt geändert durch Artikel 9 Abs. 1 des Gesetzes vom 23. November 2007 (BGBl. I S. 2631)
5. **AVID (1997):** Bewertung der Hemmhofdurchmesser und Grenzwertkonzentrationen der in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotika. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik im Arbeitsgebiet „Mikrobiologie, Parasitologie u. Hygiene“, AVID Methodensammlung, Stand XII / 97
6. **AVID (1998):** Resistenzbestimmungen schnellwachsender Bakterien (Agar-diffusionstest). Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik im Arbeitsgebiet „Mikrobiologie, Parasitologie u. Hygiene“, AVID Methodensammlung, Stand X / 98
7. **AVID (1999):** Bewertung der Hemmhofdurchmesser und Grenzwertkonzentrationen der in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotika. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik im Arbeitsgebiet „Mikrobiologie, Parasitologie u. Hygiene“, AVID Methodensammlung, Stand XII / 99

-
- 8. BFT (1999):** Antiinfektiva – Verantwortungsvoller Umgang mit Antiinfektiva zum Schutz von Tier, Mensch und Umwelt. Information vom Bundesverband für Tiergesundheit e.V., Bonn
- 9. BÖTTCHER W., U. SCHMIDT (2008):** Statistische Angaben zum Eier- und Geflügelmarkt. Geflügeljahrbuch 2009, Jahrbuch des Zentralverbandes der Deutschen Geflügelwirtschaft e.V. und seiner Mitgliedsverbände, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart
- 10. BÖTTNER A., A. DE JONG, P. SCHMID, S. SCHÜLLER, W. TRAEDER, S. WEISKOPF (2000):** Zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) für veterinärmedizinisch relevante Antibiotika zur Resistenzbeurteilung bei tierpathogenen Erregern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113, 344 – 347
- 11. BTK ArgeVET (2000):** Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln - mit Erläuterungen -. Deutsches Tierärzteblatt, 48. Jahrgang, 3 – 11
- 12. BUND (2001a):** Verordnung über meldepflichtige Erkrankungen. Vom 11. April 2001, BGBl. 2001 Teil I Nr. 16. S. 540, vom 20. April 2001, zuletzt geändert am 20.12.2005 durch BGBl. 2005 Teil I Nr. 74, S. 3499, Art. 3 vom 23. Dezember 2005, Bekanntmachung der Neufassung: BGBl. 2005 Teil I Nr. 74, S. 3516 vom 23. Dezember 2005
- 13. BUND (2001b):** Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-Verordnung) in der Fassung vom 11. April 2001 (BGBl. I, S. 544), zuletzt geändert durch Artikel 413 des Gesetzes vom 31. Oktober 2006 (BGBl. I S. 2407, 2461)
- 14. CA-SFM (2008a):** Recommondations 2008. Comité de l'Antibiogramme da la Société Francaise de Microbiologie, Edition de Janvier 2008, 1 – 49

-
- 15.CA-SFM (2008b):** Le communiqué du Groupe de Travail: Antibiogramme Veterinaires. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Janvier 2008, 1 – 10
- 16.CLSI (2008):** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Third Edition. CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
- 17.DANMAP (2007):** Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. ISSN 1600-2032
- 18.DIN (1989):** Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika; Agardiffusionstest. Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 58940-3, Ausgabe: 1989-06
- 19.DIN (2000a):** Medizinische Mikrobiologie – Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 3; Agardiffusionstest; Angaben für die Bewertung der Hemmhofdurchmesser. Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 58940-3 Beiblatt 1, Ausgabe: 2000-01
- 20.DIN (2000b):** Medizinische Mikrobiologie – Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika – Teil 4; Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration. Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 58940-4 Beiblatt 1, Ausgabe: 2000-01
- 21.DIN (2003):** Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermittel – Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. (ISO 6579:2003); Deutsches Institut für Normung e. V., DIN EN ISO 6579:2003-03

- 22.DIN (2007):** Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermittel – Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002+Amd 1:2007); Deutsches Institut für Normung e. V., DIN EN ISO 6579:2002+A1:2007
- 23.DVG (2004):** Ringversuch 2004: MHK-Bestimmung mit der Methode der Bouillon-Mikrodilution bei tierpathogenen Bakterien entsprechend NCCLS M31-A2 (2002). Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“, Prüfprotokoll, 1 – 17
- 24.EG (2003):** Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerreger.
- 25.EUCAST (2008):** Clinical Breakpoints. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html, Download vom 21.02.2009
- 26.EWERS C., T. JANßEN, L. H. WIELER (2003):** Aviäre pathogene *Escherichia coli* (APEC). Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 381 - 395
- 27.GERLACH (1988):** Zur Antibiotikaresistenz einiger gramnegativer Bakterien aus dem Klinik- und Sektionsmaterial des Instituts für Geflügelkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München. Tierärztl. Prax. 16, 161 – 162
- 28.GERLACH (1990):** Zur Antibiotikaresistenz wichtiger Bakterien aus dem Klinik- und Sektionsmaterial des Institutes für Geflügelkrankheiten. Tierärztl. Prax. 18, 501 – 502

- 29.GERMAP (2008):** Antibiotika - Resistenz und - Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. 1. Auflage, Oktober 2008, Herausgegeben von Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg, Verlag: Antiinfectives Intelligence – Gesellschaft für klinisch - mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, Rheinbach
- 30.GUERRA B., E. JUNKER, A. SCHROETER, B. MALORNY, S. LEHMANN, R. HELMUTH (2003):** Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52, 489 - 492
- 31.HEL MUTH R. (1999):** Molekulare Mechanismen der Resistenz und ihrer Ausbreitung am Beispiel der Salmonellen. Tierärztl Prax 1999; 27 (G), 306 – 309
- 32.HINZ K.-H., K.-P. BEHR, G. GLÜNDER, HOOP R.T., METHNER U., HAFEZ H. M., REETZ G. (2005):** Bakterien. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten. 6. Auflage, Siegmann – Neumann, Hrsg., Schlütersche, 200 – 265
- 33.JORGENSEN J. H., J. D. TURNIDGE (2007):** Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition, Volume 2, ASM PRESS, Washington D.C., 1146 – 1151
- 34.KIETZMANN M., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, D. KLARMANN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFFER, A. RICHTER, S. SCHWARZ, W. TRAEDER, K.-H. WALDMANN, J. WALLMANN, C. WERCKENTHIN (2004):** Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Überlegungen zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) aus klinisch-pharmakologischer Sicht. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, 81 – 87

- 35. KLARMANN D. (1997):** Antibiotika-Resistenzen wichtiger Infektionserreger 1996 in Weser-Ems. Dtsch. tierärztl. Wschr. 104, Heft 8, 325 - 335
- 36. KRASEMANN C., G. HILDENBRAND (1980):** Interpretation of agar diffusion tests. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 6, 181 – 187
- 37. KROKER R., R. SCHERKL, F. R. UNGEMACH (2002):** Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Frey H.- H., W. Löscher, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 353 - 393
- 38. KROKER R. (2006):** Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 7. Auflage, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH Co. KG, Stuttgart, 234 – 278
- 39. KRÜGER M. (2002):** Allgemeine Bakteriologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Rolle, Mayr, Hrsg., 7. Auflage, Enke Verlag Stuttgart, 377 – 415
- 40. KRÜGER M., T. SEIDLER (2007):** Allgemeine Bakteriologie. In: Rolle M., A. Mayr, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 344 – 392
- 41. LUHOFER G., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, M. KASKE, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, A. RICHTER, C. SIGGE, W. TRAEDER, K.-H. WALDMANN, J. WALLMANN, C. WERCKENTIN, S. SCHWARZ (2004):** Vorschläge der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik – Mastitis- und Großtierlayouts. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, 245 – 251

-
- 42.MERLIN (2004):** Anleitung zur Verwendung der Mikrotiterplatten (Micronaut-S Veterinäre) zur Bouillon-Mikrodilution. Version 06/2004, MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel
- 43.MOSER S. A. (2000):** Antibigrams: Transforming data into knowledge. Clinical Microbiology Newsletter 22:1, 5 – 8
- 44.NCCLS (2002):** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Second Edition. NCCLS document M31-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA
- 45.NCCLS (2004):** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Informational Supplement. NCCLS document M31-S1, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA
- 46.NIKAIDO (2009):** Multidrug Resistance in Bacteria. Annu. Rev. Biochem., 78, 8.1 – 8.28
- 47.OXOID (2007):** Handbuch, CD-Rom, OXOID GmbH, Wesel
- 48.PALKA-SANTINI M., S. PÜTZFELD, B. E. E. CLEVEN, M. KRÖNKE, O. KRUT (2007):** Rapid identification, virulence analysis and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* by gene segment – based DNA microarrays: Application to blood culture post – processing. Journal of Microbiological Methods, 68, 468 - 477
- 49.POMMIER P. (2006):** In vitro, are all the Tetracyclines equivalent? Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006, Volume 2, 411
- 50.PSCHYREMBEL (2007):** Klinisches Wörterbuch. De Gruyter, Hrsg., 261. Auflage

- 51.QS (2008):** QS – Tierarzneimittelkatalog Geflügel. QS Qualität und Sicherheit GmbH, Bonn, www.q-s.info/fileadmin/QS_Fileadmin/downloads/FleischFleischwarenUndFuttermittel/Landwirtschaft%20Tierhaltung/Gefl%FCgel/Leitfaden%20Tier-%20und%20Pflanzenproduktion%20Betriebsaudit/Anlage_QS%20Arzneimittelkatalog%20Gefl%FCgel%2026062008.pdf, Stand 26.06.2008, Download vom 18.12.08
- 52.RASHEED J. K., F. COCKERIL, F. C. TENOVER (2007):** Detection and Characterization of Antimicrobial Resistance Genes in Pathogenic Bacteria. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition, Volume 2, ASM PRESS, Washington D.C., 1146 – 1151
- 53.REBESKI D. E., H. SCHEDLETZKY (2003):** Standardisiertes Plattenformat für die Mikrodilutionsmethode zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger des Geflügels. Ausführungen zur AviPro Plate (Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Merlin Diagnostika GmbH), Manuskript zur 22. Arbeits- und Fortbildungstagung Bakteriologie des Arbeitskreises Veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostik (AVID) der DVG, Staffelstein, 17.-19.09.2003
- 54.RICE L. B., R. A. BONOMO (2007):** Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, Volume 1, ASM PRESS, Washington D.C., 1114 – 1145
- 55.ROCKSIN A. (2005):** Untersuchungen zur Implementierung des Bouillon-Mikrodilutions-verfahrens zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

- 56. SCHMIED E.-M. V. (2007):** Vergleichende Untersuchung zum Resistenzverhalten ausgewählter Bakterien von Legehennen und Eiern aus konventionellen und ökologischen Haltungssystemen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 57. SCHWARZ S., C. WERCKENTHIN (1999):** Molekularbiologische Aspekte der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen. Tagungsheft zum 23. Kongreß der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. vom 13.-16. April 1999 in Bad Nauheim, 18 – 34
- 58. SCHWARZ S., C. WERCKENTHIN (2001):** Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion. Chemotherapie Journal 10. Jahrgang, Heft 6, 197 - 202
- 59. SCHWARZ S., E. CHASLUS-DANCLA (2001):** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism of resistance. Vet. Res. 32, 201 - 225
- 60. SCHWARZ S., A. BÖTTNER, H.M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH (2003):** Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 353 – 361
- 61. SCHWARZ S., A. BÖTTNER, L. GOOSSENS, H. M. HAFEZ, K. HARTMANN, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFFER, A. RICHTER, B. SCHULZ, C. SIGGE, K.-H. WALDMANN, J. WALLMANN, C. WERCKENTHIN (2005):** Resistenztestungen mittels Bouillon-Mikrodilution: Umsetzung der Vorgaben der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ im Geflügelbereich. Tagung der Fachgruppe Geflügelkrankheiten 69. Fachgespräch, 17. – 18.11.2005, Gießen. DVG Service 2006, 46 - 52

- 62.SELBITZ H. - J. (2007):** Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M.,A. Mayr, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 393 – 558
- 63.SPENCKER F. - B. (2000):** Stand konventioneller Methoden der Antibiotikatestung und Indikation für unkonventionelle Methoden. Nach einem Vortrag auf dem Workshop „Automatische und unkonventionelle Methoden der Antibiotikatestung“ am 24. April 1999 in Mannheim. Mikrobiologe 10. Jg. 2000, 91 – 97
- 64.THAYER G.S., W. D. WALTMAN, D. P. WAGES (2008):** Other Bacterial Diseases. Streptococcus and Enterococcus. In: Diseases of Poultry, 12th Edition, Y.M. Saif (Editor-In-Chief), Blackwell Publishing Ltd, Oxford UK, 900 - 908
- 65.TROLLDENIER (1995):** Zum Resistenzverhalten veterinärmedizinisch bedeutsamer bakterieller Erreger aus dem Jahr 1992 (Rang-Reihenfolge). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 108, 127 - 132
- 66.TROLLDENIER (1996):** Resistenzentwicklungen von Infektionserregern landwirtschaftlicher Nutztiere in Deutschland (1990 – 1994) – ein Überblick. Dtsch. tierärztl. Wschr. 103, Heft 7, 256 - 260
- 67.TROLLDENIER (1999):** Antimikrobielle Tierarzneimittel: Resistenzentwicklung und Monitoring. Tagungsheft zum 23. Kongreß der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. vom 13.-16. April 1999 in Bad Nauheim, 18 – 34
- 68.TROLLDENIER (2000):** Minimale Hemmkonzentration. In: Lexikon der Veterinärmedizin. Wiesner, Ribbeck, Hrsg., 4. Auflage, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart

- 69. TURNIDGE J.D., M. J. FERRARO, J. H. JORGENSEN (2007):** Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition, Volume 2, ASM PRESS, Washington D.C., 1146 – 1151
- 70. UNGEMACH (1999):** Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang. Tierärztl Prax, 27 (G), 335 – 340
- 71. VETIDATA (2008):** Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel-anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. www.vetidata.de, Stand 23.11.2008 (Tag der Einsichtnahme)
- 72. VON GRAEFENITZ A., R. ZBINDEN, R. MUTTERS (2007):** Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Klingella, Pasteurella, and Osther Fastidious or Rarely Encountered Gram-Negative Rods. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, Volume 1, ASM PRESS, Washington D.C., 621 - 635
- 73. WALLMANN J., K. SCHRÖTER, L. H. WIELER, R. KROKER (2003):** National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. International Journal of antimicrobial Agents, 22, 420 – 428
- 74. WALLMANN J., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFFER, A. RICHTER, S. SCHWARZ, C. SIGGE, W. TRAEDER, K.-H. WALDMANN, C. WERCKENTHIN (2005):** Ergebnisse eines deutschlandweiten Ringversuches zur Implementierung der Bouillon-Mikrodilution zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Bakterien von Tieren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 118, 205 – 213

- 75. WALLMANN J., U. SCHRÖER, H. KASPAR (2007):** Quantitative resistance level (MIC) of bacterial pathogenes (Escherichia coli, Pasteurella multocida, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp., Staphylococcus aureus) isolated from chickens and turkeys: National Resistance Monitoring by the BVL 2004/2005. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 120, 452 – 463
- 76. WERCKENTHIN C., S. SCHWARZ (2003):** Kreuzresistenzen: Beurteilung von Antibiogrammen, Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und molekulare Grundlagen. Manuskript zur 22. Arbeits- und Fortbildungstagung Bakteriologie des Arbeitskreises Veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostik (AVID) der DVG, Staffelstein, 17.-19.09.2003
- 77. WERNER G., I. KLARE, J. HÜBNER, W. V. KERN, W. WITTE (2008):** Vancomycin – resistente Enterokokken. Chemother J, 17, 183 - 93
- 78. WHEAT P. F. (2001):** History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, Suppl. S1, 1 – 4
- 79. WHO (1997):** The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13 – 17 October 1997. World Health Organization, Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control, WHO/EMC/ZOO/97.4
- 80. WHO (2001):** Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. Report of a WHO consultation, Oslo, Norway 10 – 13 September 2001. World Health Organization, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.11
- 81. WHO (2007):** Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use. Report of the Second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 29 – 31 May 2007. World Health Organization, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease

-
- 82. WIELER L.H., G. BALJIER (1999):** Antibiotika und Resistenzproblematik: Hygienische und immunologische Alternativen. Tierärztl Prax 27 (G), 341- 347
- 83. YAO J.D.C., R. C. MOELLERING JR. (2007):** Antibacterial Agents. In: Murray P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, M. A. Pfaller; Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, Volume 1, ASM PRESS, Washington D.C., 1077 - 1113

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Aminopenicillinen als Vertreter der β -Lactame (KROKER et al. 2002)	19
Abbildung 2: Struktur eines Aminoglykosidantibiotikums, hier Gentamycin (KROKER et al. 2002)	20
Abbildung 3: Struktur von Enrofloxacin (KROKER et al. 2002).....	22
Abbildung 4: Struktur wichtiger Tetrazykline (KROKER et al. 2002).....	23
Abbildung 5: Struktur von Lincomycin (KROKER et al. 2002)	24
Abbildung 6: Struktur von Erythromycin (KROKER et al. 2002)	25
Abbildung 7: Struktur von Sulfonamiden (KROKER et al. 2002)	26
Abbildung 8: Struktur von Trimethoprim (KROKER et al. 2002)	26
Abbildung 9: Struktur von Tiamulin (KROKER et al. 2002).....	28
Abbildung 10: Agardiffusionstest mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Abbildung 11: Mikrotiterplatte bei der Bouillon-Mikrodilution mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Abbildung 12: Bakterienisolate im Agardiffusionstest	49
Abbildung 13: Bakterienisolate in der Bouillon-Mikrodilution	49
Abbildung 14: Layout zur Antibiotikabelegung der Mikrotiterplatte mit Legende.....	52
Abbildung 15: Agardiffusionstest mit <i>Salmonella sp.</i> auf Mueller-Hinton Agar mit Hemmhöfen.....	56
Abbildung 16: Schablonenvorlage zum Ablesen und Einteilen der HHD beim Agardiffusionstest.....	57
Abbildung 17: Mikrotiterplatte nach 18 Stunden Inkubation mit <i>E. coli</i>	60
Abbildung 18: Platte zur Dichtekontrolle eines Inokulums mit <i>Staph. aureus</i> für die Bouillon-Mikrodilution	61
Abbildung 19: Kontrolle der HHD des <i>E. coli</i> – Referenzstammes DSM 1103 mit einer Schiebleere	63
Abbildung 20: Ergebnisse der Agardiffusion, <i>E. coli</i>	67
Abbildung 21: Ergebnisse der Agardiffusion, <i>Enterococcus spp.</i>	67
Abbildung 22: Ergebnisse der Agardiffusion, <i>Klebsiella spp.</i>	68

Abbildung 23: Ergebnisse Agardiffusion, <i>Pseudomonas spp.</i>	68
Abbildung 24: Ergebnisse Agardiffusion, <i>Salmonella spp.</i>	69
Abbildung 25: Ergebnisse der Agardiffusion, <i>Staph. aureus</i>	69
Abbildung 26: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; Antibiotika	73
Abbildung 27: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>E. coli</i>	73
Abbildung 28: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>Enterococcus spp.</i>	74
Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>Klebsiella spp.</i>	74
Abbildung 30: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>Pseudomonas spp.</i>	75
Abbildung 31: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>Salmonella sp</i>	76
Abbildung 32: Vergleich der Ergebnisse beider Methoden mit Angabe der Häufigkeit von identischen Ergebnissen und Fehlern in %; <i>Staph. aureus</i>	76

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung von antibiotischen Wirkstoffen und Geflügelarten, für die in Deutschland nach Angaben von QS (2008) und VETIDATA (2008) Präparate zugelassenen sind.....	18
Tabelle 2: Beispiele für Resistenzmechanismen (RICE und BONOMO 2007)	31
Tabelle 3: Resistenzentwicklung von <i>E. coli</i> (Anteile der sensiblen Isolate in %)	36
Tabelle 4: Vergleichende Einordnung der Ergebnisse von Agardiffusionstest und MHK-Bestimmung nach TURNIDGE et al. (2007).....	41
Tabelle 5: Wirkstoffe und tiermedizinisch relevante Indikationen, wofür Grenzwerte nach CLSI (NCCLS 2004) vorhanden sind.....	45
Tabelle 6: Stellvertretersubstanzen für diverse Wirkstoffgruppen: Zusammenstellung nach WERCKENTHIN und SCHWARZ (2003) und nach CLSI (NCCLS 2004). 46	
Tabelle 7: Grenzwerte für HDD der Referenzstämme nach M31-S1 (NCCLS 2004) in mm	50
Tabelle 8: Grenzwerte für MHK der Referenzstämme nach M31-A2 und M31-S1 (NCCLS 2002, NCCLS 2004) in µg/ml	50
Tabelle 9: HDD – Grenzwerte in mm zur qualitativen Einteilung	59
Tabelle 10: Grenzwerte (break points) für MHK – Werte (in µg/ml)	62
Tabelle 11: Keimspektrum im Agardiffusionstest.....	65
Tabelle 12: Keimspektrum in der Bouillon-Mikrodilution	70
Tabelle 13: MHK ₅₀ und MHK ₉₀ der getesteten Bakterien (in µg/ml)	71
Tabelle 14: Korrelationskoeffizient und Cohen`s Kappa als Grad der Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse beider Methoden	77
Tabelle 15: Ergebnisse der Agardiffusionstests, grampositive Bakterien	113
Tabelle 16: Ergebnisse der Agardiffusionstests, gramnegative Bakterien.....	114
Tabelle 17: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, grampositive Bakterien (Teil1) 115	
Tabelle 18: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, grampositive Bakterien (Teil2) 116	
Tabelle 19: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, gramnegative Bakterien (Teil1) 117	
Tabelle 20: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, gramnegative Bakterien (Teil2) 118	
Tabelle 21: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Escherichia coli</i>	119
Tabelle 22: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Enterococcus spp.</i>	120
Tabelle 23: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Staphylococcus aureus</i>	121
Tabelle 24: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Pseudomonas spp.</i>	122

Tabelle 25: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Klebsiella spp.</i>	123
Tabelle 26: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei <i>Salmonella spp.</i>	124
Tabelle 27: Qualitative Ergebnisse aus Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution bezüglich der getesteten Antibiotika im Vergleich	125
Tabelle 28: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>E. coli</i>	126
Tabelle 29: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>Enterococcus spp.</i>	127
Tabelle 30: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>Klebsiella spp.</i>	128
Tabelle 31: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>Pseudomonas spp.</i>	129
Tabelle 32: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>Salmonella spp.</i>	130
Tabelle 33: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon- Mikrodilution für <i>Staph. aureus</i>	131

9.3 Zusammensetzung der Fertignährböden

Chromogener Salmonella Selektivagar (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Spezialpepton 10,0

Chromogene Substanzen 28,0

Cefsulodin 0,012

Novobiocin 0,005

Agar 12,0

Columbia Agar mit Schafblut – COL (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Spezialpepton 23,0

Stärke 1,0

Natriumchlorid 5,0

Agar 11,0

Defibriniertes Schafblut 70,0 ml

Eosin Methylenblau Agar – EMB/ Levine, modifiziert (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Pepton 10,0

Lactose 10,0

Dikaliumhydrogenphosphat 2,0

Eosin Y 0,4

Methylenblau 0,065

Agar 15,0

Kanamycin Äsculin Azid Selektivnährboden/ Enterokokken-Agar (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton 20,0

Hefeextrakt 5,0

Natriumchlorid 5,0

Natriumcitrat 1,0

Äsculin 1,0

Eisen(III)-ammoniumcitrat 0,5

Natriumazid 0,15

Kanamycin 0,02

Agar 10,0

Mueller Hinton Agar – MH (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g 2,0

Caseinhydrolysat 17,5

Stärke 1,5

Agar 17,0

Mueller Hinton Agar mit Schafblut (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g 2,0

Caseinhydrolysat 17,5

Stärke 1,5

Agar 17,0

Defibriniertes Schafblut 50,0 ml

**Mueller Hinton - II - Bouillon (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg;
Verpackungsangaben)**

Typische Zusammensetzung in g/l:

Rindfleisch (getrocknete Infusion aus 300g) 2,0

Caseinhydrolysat 17,5

Stärke 1,5

pH 7,4 +/- 0,2

Zubereitung:

21g Mueller-Hinton-Bouillon in 1L Aqua dest. lösen, 15 Minuten bei 121°C
autoklavieren

Peptonwasser, gepuffert (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg;
Verpackungsangaben)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Pepton 10,0

Natriumchlorid 5,0

Dinatriumhydrogenphosphat 3,5

Monokaliumphosphat 1,5

pH 7,2 +/- 0,2

Zubereitung:

20g Peptonwasser, gepuffert in 1L Aqua dest. lösen, gut mischen und auf Gefäße verteilen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Rappaport-Vasiliadis-Anreicherungslösung (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung (g/1.110 ml)

Sojapepton 5,0

Natriumchlorid 8,0

Kaliumdihydrogenphosphat 1,6

Magnesiumchlorid x 6 H₂O 40,0

Malachitgrün 0,04

pH 5,2 ± 0,2

Zubereitung:

30g Rappaport-Vasiliadis-Anreicherungslösung in 1L Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen vorsichtig erhitzen. Je 10 ml Volumen in Endgefäße abfüllen und 15 Minuten bei 115°C autoklavieren.

Staphylokokken / Streptokokken Selektivnährboden - CNA (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Spezialpepton 23,0

Stärke 1,0

Natriumchlorid 5,0

Nalidixinsäure 0,005

Colistin 0,0075

Agar 10,0

Defibriniertes Schafblut 70,0 ml

X.L.D. Agar (OXOID 2007)

Typische Zusammensetzung in g/l:

Hefeextrakt 3,0

Lysin 5,0

Xylose 3,75

Lactose 7,5

Saccharose 7,5

Natriumdesoxycholat 1,0

Natriumchlorid 5,0

Natriumthiosulfat 6,8

Eisen(III)-ammoniumcitrat 0,8

Phenolrot 0,08

Agar 12,5

9.4 Ergebnis-Tabellen (Empfindlichkeit)

9.4.1 Agardiffusion

Tabelle 15: Ergebnisse der Agardiffusionstests, grampositive Bakterien

Grampositive Bakterien		<u>Amp</u>	<u>Enr</u>	<u>Ery</u>	<u>Lin</u>	<u>Neo</u>	<u>Pen</u>	<u>SXT</u>	<u>Tet</u>
Gesamt n=970	get.	970	970	970	970	970	324	970	970
	i	16	532	296	32	-	4	14	23
	r	53	119	321	797	722	37	148	590
	s	901	319	353	141	248	283	808	357
	s(%)	92,9	32,9	36,4	14,6	25,6	87,6	83,3	36,8
<i>Kat.-pos. Kokken</i> n=129	get.	129	129	129	129	129	47	129	129
	i	3	29	13	20	-	0	7	1
	r	17	9	60	67	10	12	30	60
	s	109	91	56	42	119	35	92	68
	s(%)	84,5	70,5	43,4	32,6	92,3	74,5	71,3	52,7
<i>Staphylococcus aureus</i> n=80	get.	80	80	80	80	80	35	80	80
	i	2	6	2	1	-	0	1	0
	r	12	28	5	8	4	5	1	25
	s	66	46	73	71	76	30	78	55
	s(%)	82,5	57,5	91,3	88,8	95,0	85,7	97,5	68,8
<i>Enterococcus spp.</i> n=742	get.	742	742	742	742	742	239	742	742
	i	10	492	279	8	-	4	5	20
	r	21	76	245	708	697	19	110	498
	s	711	174	218	26	45	216	627	224
	s(%)	95,8	23,5	29,4	3,5	6,1	90,8	84,5	30,2
Andere n=19	get.	19	19	19	19	19	3	19	19
	i	1	5	2	3	-	0	1	2
	r	3	6	11	14	11	1	7	7
	S	15	8	6	2	8	2	11	10
	s(%)	78,9	42,1	31,6	10,5	42,1	0,67	57,9	52,6

Tabelle 16: Ergebnisse der Agardiffusionstests, gramnegative Bakterien

Gramnegative Bakterien		<u>Amp</u>	<u>Col</u>	<u>Enr</u>	<u>Neo</u>	<u>Spe</u>	<u>SXT</u>	<u>Tet</u>
Gesamt n=1492	get. i r s	1492 38 801 653	1492 2 20 1470	1492 246 94 1152	1492 - 307 1185	148 32 41 75	1492 4 460 1028	1492 20 586 886
	s(%)	43,8	98,5	77,3	79,4	51,0	68,9	59,4
<i>Escherichia coli</i> n=1325	get. i r s	1325 37 654 634	1325 1 12 1312	1325 202 89 1034	1325 - 251 1074	122 28 28 66	1325 4 392 929	1325 4 529 792
	s(%)	47,8	99,0	78,0	81,1	54,1	70,1	59,8
<i>Salmonella</i> spp. n=12	get. i r s	12 0 3 9	12 0 0 12	12 0 0 12	12 - 2 10	0 - - -	12 0 2 10	12 1 0 11
	s(%)	75,0	100,0	100,0	83,3	-	83,3	91,7
<i>Klebsiella</i> spp. n=55	get. i r s	55 0 55 0	55 0 0 55	55 2 1 52	55 - 21 34	18 3 6 9	55 0 12 43	55 1 13 41
	s(%)	0	100,0	94,5	61,8	50,0	78,2	74,5
<i>Pseudomonas</i> spp. n=53	get. i r s	53 0 53 0	53 0 2 51	53 38 1 14	53 - 21 32	7 0 7 0	53 0 43 10	53 7 32 14
	s(%)	0	96,2	26,9	60,4	0	18,9	26,4
Andere n=47	get. i r s	47 1 36 10	47 1 6 40	47 4 3 40	47 - 12 35	1 1 - -	47 0 11 36	47 7 12 28
	s(%)	21,3	85,1	85,1	74,5	-	76,6	59,6

9.4.2 Bouillon-Mikrodilution

**Tabelle 17: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, grampositive Bakterien
(Teil1)**

Grampositive Bakterien		<u>Amp</u>	<u>Enr</u>	<u>Ery</u>	<u>Cli</u>	<u>Neo</u>	<u>Pen</u>
Gesamt n=252	get.	252	252	252	252	252	252
	i	0	91	100	11	6	0
	r	31	34	113	146	134	33
	s	221	127	39	95	112	219
	s (%)	87,7	50,4	15,5	37,7	44,4	86,9
<i>Kat.-pos. Kokken (ohne Staph. aureus)</i> n=19	get.	19	19	19	19	19	19
	i	-	3	3	5	0	-
	r	9	0	11	4	1	9
	s	10	16	5	10	18	10
	s (%)	52,6	84,2	26,3	52,6	94,7	52,6
<i>Staphylococcus aureus</i> n=77	get.	77	77	77	77	77	77
	i	-	9	49	0	1	-
	r	16	20	3	4	0	16
	s	61	48	25	73	76	61
	s (%)	79,2	62,3	32,5	94,8	98,7	79,2
<i>Enterococcus spp.</i> n=152	get.	152	152	152	152	152	152
	i	-	77	47	5	5	-
	r	6	12	98	138	133	8
	s	146	63	7	9	14	144
	s (%)	96,1	41,4	4,6	5,9	9,2	94,7
<i>Streptococcus spp.</i> n=4	get.	4	4	4	4	4	4
	i	0	2	1	1	0	0
	r	0	2	1	0	0	0
	s	4	0	2	3	4	4
	s (%)	100,0	100,0	50,0	75,0	100,0	100,0

**Tabelle 18: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, grampositive Bakterien
(Teil2)**

<i>Grampositive Bakterien</i>		<u>Spe</u>	<u>SXT</u>	<u>Tet</u>	<u>Tia</u>	<u>Til</u>
Gesamt n=252	get.	252	252	252	252	252
	i	12	5	1	-	7
	r	230	17	138	159	173
	s	10	230	113	93	72
	s (%)	4,0	91,3	44,8	36,9	28,6
Kat.-pos. Kokken (ohne Staph. aureus) n=19	get.	19	19	19	19	19
	i	1	3	0	-	3
	r	18	6	11	13	10
	s	0	10	8	6	6
	s (%)	0	52,6	42,1	31,6	31,6
<i>Staph. aureus</i> n=77	get.	77	77	77	77	77
	i	2	1	0	-	3
	r	73	0	23	4	10
	s	2	76	54	73	64
	s (%)	2,6	98,7	70,1	94,8	83,1
<i>Enterococcus spp.</i> n=152	get.	152	152	152	152	152
	i	7	1	1	-	0
	r	137	10	102	139	151
	s	8	141	49	13	1
	s (%)	5,3	92,7	32,2	8,6	0,7
<i>Streptococcus spp.</i> n=4	get.	4	4	4	4	4
	i	2	0	0	-	1
	r	2	1	2	3	2
	s	0	3	2	1	1
	s (%)	0	75,0	50,0	25,0	25,0

Tabelle 19: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, gramnegative Bakterien
(Teil1)

Gramnegative Bakterien		<u>Amp</u>	<u>Col</u>	<u>Enr</u>	<u>Neo</u>	<u>Spe</u>	<u>SXT</u>	<u>Tet</u>
Gesamt n=304	get.	304	304	304	304	304	304	304
	i	5	10	94	15	96	14	5
	r	138	7	17	26	99	116	132
	s	161	287	193	163	109	174	167
	s (%)	53,0	94,4	91,0	53,6	35,9	57,2	54,9
<i>Escherichia coli</i> n=212	get.	212	212	212	212	212	212	212
	i	0	5	74	8	72	2	0
	r	104	6	14	23	57	83	101
	s	108	201	124	181	83	127	111
	s (%)	50,9	94,8	58,5	85,4	39,2	59,9	52,4
<i>Salmonella</i> spp. n=12	get.	12	12	12	12	12	12	12
	i	0	0	0	1	3	0	0
	r	3	0	0	0	9	2	0
	s	9	12	12	11	0	10	12
	s (%)	75,0	100,0	100,0	91,7	0	83,3	100,0
<i>Klebsiella</i> spp. n=32	get.	32	32	32	32	32	32	32
	i	5	1	0	0	6	1	0
	r	25	0	1	0	2	3	5
	s	2	31	31	32	24	28	27
	s (%)	6,3	96,9	96,9	100,0	75,0	87,5	84,4
<i>Pseudomonas</i> spp. n=41	get.	41	41	41	41	41	41	41
	i	0	4	20	6	10	11	4
	r	41	0	1	3	30	25	25
	s	0	37	20	32	1	5	12
	s (%)	0	90,3	48,8	78,0	2,4	12,2	29,3
Andere n=7	get.	7	7	7	7	7	7	7
	i	0	0	0	0	5	0	1
	r	6	1	1	0	1	3	1
	s	1	6	6	7	1	4	5
	s (%)	14,3	85,7	85,7	100,0	14,3	57,1	71,4

**Tabelle 20: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution, gramnegative Bakterien
(Teil2)**

Gramnegative Bakterien		<u>Tia</u>	Gramnegative Bakterien		<u>Tia</u>
Gesamt n=304	get.	304	<i>Klebsiella</i> spp. n=32	get.	32
	i r s	- 299 5		i r s	- 32 0
	s (%)	1,6		s (%)	0
<i>Escherichia coli</i> n=212	get.	212	<i>Pseudomonas</i> spp. n=41	get.	41
	i r s	- 209 3		i r s	- 40 1
	s (%)	1,4		s (%)	2,4
<i>Salmonella</i> spp. n=12	get.	12	Andere n=7	get.	7
	i r s	- 12 0		i r s	- 6 1
	s (%)	0		s (%)	14,3

9.5 MHK-Ergebnisse

Die Tabellen 21 bis 26 zeigen die Verteilung der Minimalen Hemmkonzentrationen der in der Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten antibiotischen Wirkstoffe für die wichtigsten Bakteriengruppen in der Studie. Aufgeführt sind die Ergebnisse für *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Staph. aureus*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. und *Salmonella* spp.. Die grau unterlegten Felder kennzeichnen diejenigen Konzentrationsstufen, welche auf der verwendeten Mikrotiterplatte tatsächlich zur MHK-Bestimmung vorhanden waren. Die Werte oberhalb dieses Bereiches (grau unterlegte Zahlen) konnten daher keiner bestimmten MHK mehr zugeordnet werden. Hier kann nur festgestellt werden, dass die dazugehörige MHK größer als der oberste Wert im Untersuchten Bereich sein muss. Gleiches gilt für den niedrigsten Wert im Untersuchungsbereich (fett geschriebene Zahlen). Auch hier konnte keine exakte MHK zugeordnet werden, diese wäre nämlich kleiner oder gleich des aufgeführten Wertes.

Tabelle 25: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei *Klebsiella spp.*

Konzentration in µg/ml für SXT	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2:38	4/76	>4/76											
AB-Konzentration in µg/ml	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128				n
Amp								2	5	16	9						32
Anteil in %								6,3	15,6	50	28,1						
Col				31	1												32
Anteil in %				96,9	3,1												
Enr	27	2	2				1										32
Anteil in %	84,4	6,3	6,3			3,1											
Neo								32									32
Anteil in %								100									
Spe								1	1	22	6		2				32
Anteil in %								3,1	3,1	68,8	18,8		6,3				
SXT	28			1		3											32
Anteil in %	87,5			3,1		9,4											
Tet					15	9	3			5							32
Anteil in %					46,9	28,2	9,4			15,6							
Tia										3	29						32
Anteil in %										9,4	90,6						

Tabelle 26: Verteilung der MHK-Ergebnisse bei *Salmonella* spp.

Konzentration in µg/ml für SXT	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	>4/76	4	8	16	32	64	128	>128	n
AB-Konzentration in µg/ml	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	n
Amp					8	1					3			12
Anteil in %					66,7	8,3					25,0			
Col				12										12
Anteil in %				100,0										
Enr	12													12
Anteil in %	100,0													
Neo								11	1					12
Anteil in %								91,7	8,3					
Spe											3	9		12
Anteil in %											25,0	75,0		
SXT	10					2								12
Anteil in %	83,3					16,7								
Tet					6	5	1							12
Anteil in %					50,0	41,7	8,3							
Tia											12			12
Anteil in %											100,0			

9.6 Kreuztabellen von Ergebnissen beider Methoden

Tabelle 27: Qualitative Ergebnisse aus Agardiffusion und Bouillon-

Mikrodilution bezüglich der getesteten Antibiotika im Vergleich

<u>Amp</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	199	3	8	210
	i	5			5
	s	14	16	311	341
gesamt		218	19	319	556

<u>Col</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	6		1	7
	i			10	10
	s	3		284	287
gesamt		9		295	304

<u>Enr</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	49	2		51
	i	14	137	34	185
	s	1	62	257	320
gesamt		64	201	291	556

<u>Ery</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	57	51	5	113
	i	2	38	60	100
	s	1	2	36	39
gesamt		60	91	101	252

<u>Lin/Cli</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	145	1		146
	i	7	2	2	11
	s	6	7	82	95
gesamt		158	10	84	252

<u>Neo</u>		Agardiffusion			Gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	158		2	160
	i	17		4	21
	s	79		296	375
gesamt		254		302	556

<u>Pen</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	9			9
	i				
	s			82	82
gesamt		9		82	91

<u>SXT</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	125	1	7	133
	i	15	2	2	19
	s	23		381	404
gesamt		163	3	390	556

<u>Tet</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	257	9	4	270
	i	3	2	1	6
	s	16	8	256	280
gesamt		276	19	261	556

Tabelle 28: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *E. coli*

Escherichia coli

<u>Amp</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	101	1	2	104
	i				
	s	7	16	85	108
gesamt		108	17	87	212

<u>Col</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	5		1	6
	i			5	5
	s	2		199	201
gesamt		7		205	212

<u>Enr</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	14			14
	i	1	45	28	74
	s	1	3	120	124
gesamt		16	48	148	212

<u>Neo</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	22		1	23
	i	7		1	8
	s	39		142	181
gesamt		68		144	212

<u>SXT</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	80		3	83
	i	1		1	2
	s	4		123	127
gesamt		85		127	212

<u>Tet</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	100		1	101
	i				
	s	6	1	104	111
gesamt		106	1	105	212

Tabelle 29: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp.

Amp		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	4		2	6
	i				
	s	1		145	146
gesamt		5		147	152

Enr		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	10	2		12
	i	5	68	4	77
	s		39	24	63
gesamt		15	109	28	152

Ery		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	44	50	4	98
	i	1	33	13	47
	s		1	6	7
gesamt		45	84	23	152

Lin/Cli		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	137	1		138
	i	4		1	5
	s	2		7	9
gesamt		143	1	8	152

Neo		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	133			133
	i	5			5
	s	12		2	14
gesamt		150		2	152

Pen		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	1			1
	i				
	s			54	54
gesamt		1		54	55

SXT		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	9		1	10
	i	1			1
	s	19		122	141
gesamt		29		123	152

Tet		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	93	7	2	102
	i	1			1
	s	7	3	39	49
gesamt		101	10	41	152

Tabelle 30: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *Klebsiella spp.*

Klebsiella spp.

<u>Amp</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	25			25
	i	5			5
	s	2			2
gesamt		32			32

<u>Col</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r				
	i			1	1
	s			31	31
gesamt				32	32

<u>Enr</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	1			1
	i				
	s			31	31
gesamt		1		31	32

<u>Neo</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r				
	i				
	s	9		23	32
gesamt		9		23	32

<u>SXT</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	3			3
	i	1			1
	s			28	28
gesamt		4		28	32

<u>Tet</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	5			5
	i				
	s	1	1	25	27
gesamt		6	1	25	32

Tabelle 31: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp.

<u>Amp</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	41			41
	i				
	s				
gesamt		41			41

<u>Col</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r				
	i			4	4
	s	1		36	37
gesamt		1		40	41

<u>Enr</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	1			1
	i		18	2	20
	s		13	7	20
gesamt		1	31	9	41

<u>Neo</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	2		1	3
	i	5		1	6
	s	9		23	32
gesamt		16		25	41

<u>SXT</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	24		1	25
	i	10		1	11
	s			5	5
gesamt		34		7	41

<u>Tet</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	24	1		25
	i	1	2	1	4
	s		2	10	12
gesamt		25	5	11	41

Tabelle 32: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *Salmonella spp.*

Salmonella spp.												
Amp		Agardiffusion			gesamt	Col		Agardiffusion			gesamt	
		r	i	s				r	i	s		
Bouillon-Mikro-dilution	r	3			3	Bouillon-Mikro-dilution	r					
	i						i					
	s			9	9		s			12	12	
gesamt			3		9	12	gesamt				12	12

Enr		Agardiffusion			gesamt	Neo		Agardiffusion			gesamt		
		r	i	s				r	i	s			
Bouillon-Mikro-dilution	r					Bouillon-Mikro-dilution	r						
	i						i			1	1		
	s			12	12		s	2		9	11		
gesamt					12	12	gesamt			2		10	12

SXT		Agardiffusion			gesamt	Tet		Agardiffusion			gesamt		
		r	i	s				r	i	s			
Bouillon-Mikro-dilution	r	2			2	Bouillon-Mikro-dilution	r						
	i						i						
	s			10	10		s		1	11	12		
gesamt			2		10	12	gesamt				1	11	12

Tabelle 33: Vergleich der qualitativen Ergebnisse von Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution für *Staph. aureus*

Staphylococcus aureus											
<u>Amp</u>		Agardiffusion			gesamt	<u>Enr</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s				r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	13	2	1	16	Bouillon-Mikro-dilution	r	20			20
	i						i	7	2		9
	s	1		60	61		s		3	45	48
gesamt		14	2	61	77	gesamt		27	5	45	77

<u>Ery</u>		Agardiffusion			gesamt	<u>Lin/Cli</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s				r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r	3			3	Bouillon-Mikro-dilution	r	4			4
	i	1	3	45	49		i				
	s		1	24	25		s	3	2	68	73
gesamt		4	4	69	77	gesamt		7	2	68	77

<u>Neo</u>		Agardiffusion			gesamt	<u>Pen</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s				r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r					Bouillon-Mikro-dilution	r	6			6
	i			1	1		i				
	s	3		73	76		s			24	24
gesamt		3		74	77	gesamt		6		24	30

<u>SXT</u>		Agardiffusion			gesamt	<u>Tet</u>		Agardiffusion			gesamt
		r	i	s				r	i	s	
Bouillon-Mikro-dilution	r					Bouillon-Mikro-dilution	r	22		1	23
	i	1			1		i				
	s			76	76		s			54	54
gesamt		1		76	77	gesamt		22		55	77

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Rüdiger T. Korb für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und aller notwendigen Mittel, sowie für dessen Unterstützung und das Vertrauen, das mir während der gesamten Zeit entgegen gebracht wurde.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Kristin Kahl für die Vermittlung dieser Dissertationsarbeit und die nette Betreuung besonders während der Planungsphase des Projektes, sowie Frau Iris Daum für ihre Unterstützung.

Ein großer und spezieller Dank gilt Frau Bärbel Hohenleitner für ihre ständige tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, sowie dem gesamten Team der bakteriologischen Abteilung der Klinik für Vögel, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein herzlicher Dank gilt zudem allen hier nicht namentlich genannten MitarbeiterInnen an der Klinik für Vögel für deren Hilfsbereitschaft und die sehr nette und angenehme Arbeitsatmosphäre in allen Bereichen der Klinik.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Christiane Werckenthin und den MitarbeiterInnen am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät für die Möglichkeit der praktischen Einarbeitung in die Bouillon - Mikrodilutionsmethode und den ein oder anderen Ratschlag hierzu.

Weiter bin ich dankbar für die beratende Unterstützung durch Frau Monia Mahling vom statistischen Beratungslabor (STABLAB) des Instituts für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Küchenhoff.

Bei meiner Schwester Anita bedanke ich mich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für deren Vertrauen und deren moralische und finanzielle Unterstützung, sowie meiner Schwester und allen meinen Freunden für deren großes Verständnis, während der Studienzeit und der Anfertigung dieser Arbeit.

